

ESTUDOS ELECTROFORÉTICOS

1.º — MÉTODOS E TÉCNICA

POR GÜNTER HÖXTER & RAUL MUNGIOLI
(da Secção de Fisico-química do Instituto Butantan)

CONTEÚDO

- I) Introdução.
- II) Teoria do movimento de partículas coloidais num campo eléctrico.
- III) Método electroforético.
 - a) Descrição geral do aparelho.
 - b) Instalações mecânicas.
 - c) Ligações eléctricas.
 - d) Sistema óptico.
 - 1 — Formação das imagens.
 - 2 — Método de Longworth.
 - 3 — Método de Lamm.
 - 4 — Método de Philpot-Svensson.
 - 5 — Ajustamento do sistema óptico.
 - 6 — Diferença entre lâmina e fenda.
- IV) Técnica do experimento electroforético.
 - a) Preparo do material.
 - b) Diálise.
 - c) Preparo da célula.
 - d) Formação do perfil.
- V) Análise das observações electroforéticas.
 - a) Análise dos traçados.
 - b) Análise geométrica.
 - c) Método de Tiselius e Kabat.
 - d) Método de Pedersen.
 - e) Método de Labhart.
 - f) Método de Wiedemann.
 - g) Nosso método.
 - h) Cálculo da mobilidade aparente.
- VI) Resumo da parte técnica.
- VII) Referências bibliográficas.

Entregue para publicação em 14 de novembro de 1949.

I) INTRODUÇÃO

Uma das mais valiosas contribuições da fisico-química aos estudos biológicos é a electroforese. No sentido largo da palavra, electroforese significa o movimento de partículas carregadas num campo eléctrico. A técnica electroforética, desenvolvida pelos trabalhos de Tiselius e Longsworth, permite a observação destas migrações, a determinação das mobilidades, a separação de substâncias que caminham com velocidades diferentes, e a avaliação das quantidades relativas de cada espécie de uma tal mistura. Como as forças eléctricas do campo exercem apenas uma ação muito leve sobre as propriedades eléctricas da superfície de cada partícula, o método é aplicável por excelência ao estudo dos biocoloides e especialmente das proteínas.

Um dos princípios biológicos do ser vivo é a sua adaptabilidade às modificações do ambiente; na molécula proteica, este fato reflete-se pela resposta amfotérica: em meio ácido, a proteína reage como uma substância básica, formando cations (de carga positiva); em meio alcalino, ela se transforma em anions (de carga negativa). Estas modificações processam-se instantaneamente por mudanças do pH externo, sem influir na estrutura interna da molécula.

Entre a forma positiva e a negativa da proteína existe um estado neutro onde a carga total é zero. O pH correspondente a esta neutralidade é o ponto iso-eléctrico, onde a mobilidade também é zero. Num pH abaixo deste ponto, a proteína caminha para o pólo negativo, acima dele a migração se processa em direção ao pólo positivo. Quanto mais afastado do ponto iso-eléctrico, tanto maior será a velocidade de migração numa ou noutra direção.

O ponto iso-eléctrico é uma característica estrutural da cada proteína e um dos critérios de identidade fisico-química. Numa mistura de proteínas cujos pontos iso-eléctricos não coincidem, temos a possibilidade de separar as proteínas pela diferença das mobilidades. O seguinte quadro exemplifica estas diferenças para a mistura das proteínas plasmáticas humanas:

Fracção proteica	Mobilidade a pH 8,6	Ponto iso-eléc- trico
albumina	5,94	4,6
globulina α_1	5,07	4,7 (?)
globulina α_2	4,08	4,8
globulina β	2,83	5,2
fibrinogênio	2,14	5,4
globulina γ	1,02	6,4

O tratamento das proteínas neste processo é tão suave que mesmo substâncias instáveis como fibrinogênio ou enzimas podem ser submetidas á investigação electroforética. As nossas pesquisas abrangem o estudo das propriedades electroforéticas das seguintes substâncias:

- Proteínas plasmáticas de homem, cão e cavalo, e suas modificações nos envenenamentos por peçonhas.
- Proteínas do soro de cavalos e suas modificações no decurso da imunização contra vários antígenos.
- Proteínas plasmáticas humanas e suas modificações por doenças.
- Proteínas plasmáticas normais dos animais de laboratório.
- Soros terapêuticos submetidos a vários processos de purificação e concentração.
- Venenos de cobras, escorpiões, aranhas e abelhas.

Como não encontramos nenhuma descrição da electroforese em idioma português, iniciamos a nossa publicação com um resumo da teoria geral do movimento de partículas carregadas, dando em seguida todos os detalhes da nossa técnica que se baseia nas recomendações apresentadas pelos trabalhos de Tiselius, de Longsworth, e de Wiedemann.

II) TEORIA DO MOVIMENTO DE PARTÍCULAS COLOIDAIIS NUM CAMPO ELÉCTRICO

Uma partícula de carga eléctrica constante vai se movimentar num campo eléctrico contínuo em direção ao pólo de carga oposta. Quando a partícula for de tamanho pequeno, como os ions por exemplo, o fenómeno da migração no campo eléctrico recebe o nome de iontoforese. Neste caso, e para partículas esféricas que se movimentam sem interferência pelas outras partículas, como por exemplo em diluição infinita, a velocidade (v) é uma função da carga (q) e do

raio (r) da partícula, da força (H) do campo eléctrico, e da viscosidade (η) do meio onde a partícula caminha.

$$v = \frac{q H}{6\pi r \eta} \quad (\text{Fórmula 1.})$$

Para partículas de forma desconhecida é melhor usar a seguinte fórmula:

$$v = \frac{q H D}{k T} \quad (\text{Fórmula 2.})$$

onde D = constante de difusão da partícula naquele meio

T = temperatura absoluta ($^{\circ}$ Kelvin)

k = constante de Boltzmann.

Estas fórmulas só podem ser aplicadas quando cada partícula se movimenta independente de outras partículas, num ambiente isento de outras cargas. A mobilidade (u) que significa a velocidade da partícula num campo eléctrico de força $H=1$, é

$$u = \frac{v}{H} = \frac{q D}{k T} \quad (\text{Fórmula 3.})$$

A electroforese difere da iontoforese pelo fato de se caracterizar por uma mobilidade menor do que aquela calculada pela fórmula 3. A partícula coloidal cujo movimento observamos na electroforese exerce uma atração sobre os dipolos do solvente e sobre os ions de carga oposta que provêm da dissociação das substâncias tampões e de outros sais presentes. A núvem destes ions que circundam a partícula carregada vai se movimentar na direção oposta e deste maneira diminuir a mobilidade, dependendo este efeito ralentador da fôrma e do tamanho da partícula coloidal que forma o núcleo, e da concentração e carga — mas não da natureza química — destes ions na núvem (Gouy). Quando a concentração dos outros ions é grande em comparação com a concentração do coloide nuclear, podemos calcular a fôrça iônica (μ) pela fórmula de Lewis

(Fórmula 4.)

$$\mu = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2$$

onde c_i = concentração de cada espécie de ions

z_i = valência de cada espécie de ions

Nas determinações electroforéticas é preciso indicar sempre a força iônica (μ) do meio usado, pois o valor numérico da mobilidade depende deste fator. O efeito ralentador desta nuvem iônica sobre a mobilidade da partícula central pode ser calculada (segundo Gorin) á base das teorias de Helmholtz e de Freundlich e von Smoluchowski. Assim, o sistema "coloide + nuvem iônica" pode ser considerado um condensador com uma camada formada pelo coloide central e outra pelos ions de carga oposta. A distância entre estas camadas é conhecida como a grossura da camada eléctrica dupla (Helmholtz); ela é infinita em diluição infinita e diminui com o aumento da concentração iônica quando a casca iônica se aproxima cada vez mais do coloide nuclear. Segundo Freundlich e von Smoluchowski, entretanto, esta casca iônica que forma a placa externa do condensador não tem limites exteriores abruptos, mas continua estendendo-se através do líquido circundante. No lugar do condensador de Helmholtz podemos agora colocar uma partícula carregada que se circunda de um campo eléctrico. O potencial deste campo é constituído pelo potencial electrocinético (ζ) que na ausência de sais é uma função da carga (q), do raio (r) da partícula (presupostamente esférica) e da constante di-eléctrica (ϵ) do solvente.

$$\zeta = \frac{q}{\epsilon r} \quad (\text{Fórmula 5.})$$

Combinando agora as fórmulas 1. e 3. e substituindo a carga (q) pelo valor da fórmula 5. vamos obter a mobilidade electroforética

$$u = \frac{v}{H} = \frac{q}{6 \pi r \eta} = \frac{\zeta \epsilon}{6 \pi \eta} \quad (\text{Fórmula 6.})$$

Esta fórmula corresponde áquela derivada por Debye e Hückel para uma partícula esférica isolada de outros ions. Helmholtz calculou a seguinte equação.

$$u = \frac{\zeta \epsilon}{4 \pi \eta} \quad (\text{Fórmula 7.})$$

para uma partícula cilíndrica com o eixo na direcção do campo eléctrico. Podemos generalizar estas fórmulas escrevendo

$$u = \frac{\zeta \epsilon}{C \eta} \quad (\text{Fórmula 8.})$$

onde (C) é uma constante que depende da forma da partícula, mas não do seu tamanho. $C = 4 \pi$ para cilindros, e $C = 6 \pi$ para esferas. O potencial electrocinético depende somente da natureza da superfície da partícula, e a mobilidade fica assim independente do seu tamanho. A presença da nuvem iônica vai modificar esta mobilidade por um fator que depende da grossura (d) da camada eléctrica dupla, ou, em outras palavras, da distância do centro eléctrico desta nuvem. Podemos calcular o potencial electrocinético resultante (ζ^R) pela fórmula

$$\zeta = \frac{q}{\epsilon r} - \frac{q}{\epsilon(r+d)} = \frac{q}{\epsilon r} \frac{d}{(r+d)} \quad (\text{Fórmula 9.})$$

Combinando agora

$$u = \frac{q}{C r \eta} \text{ com } q = \zeta \epsilon r \left(\frac{r}{d} + 1 \right) \text{ da fórmula 9.}$$

vamos obter

$$u = \frac{\zeta^R \epsilon}{C \eta} \left(1 + \frac{r}{d} \right) \quad (\text{Fórmula 10.})$$

Quando (d) fica grande, em soluções diluídas, a mobilidade se aproxima da fórmula 8. Na derivação de Debye e Hückel

$$u = \frac{\zeta \epsilon}{6 \pi \eta} (1 + \kappa r) \quad (\text{Fórmula 11.})$$

relacionando (κ) com (d) pela fórmula

$$d = \frac{1}{\kappa} \times \frac{\kappa r}{1 + \kappa r} \quad (\text{Fórmula 12.})$$

Para partículas grandes onde $\kappa r \gg 1$ a grossura (d) fica independente do tamanho (r), um fato verificado experimentalmente por Abramson e por Mooney que observaram que a mobilidade num campo eléctrico de partículas esféricas de

uma emulsão cresce com um aumento do raio até atingir um valor limite acima do qual a mobilidade se torna independente do raio. A adição de sais nestas emulsões tende a igualar a mobilidade para partículas de todas as dimensões; o mesmo acontece quando as gotículas da emulsão são cobertas com um filme de proteína. O valor de (d) pode ser calculado pela fórmula.

$$d^2 = \frac{\epsilon k T}{8 \pi N e^2 \mu} \quad (\text{Fórmula 13.})$$

onde N = número de Avogadro

e = carga do elétron

μ = força iônica

Para o valor de (κ) da fórmula de Debye e Hückel existe uma expressão idêntica:

$$\kappa^2 = \frac{8 \pi N e^2 \mu}{\epsilon k T} \quad (\text{Fórmula 14.})$$

Entretanto, a fórmula 14. só pode ser aplicada no caso da dissociação total. Assim, para soluções aquosas de sais monovalentes, a 0.º C. e com (ϵ) igual á constante di-elétrica da água

$$\frac{1}{\kappa} = \frac{3,06}{\sqrt{c}} \times 10^{-8} \text{ cm} \quad \text{onde } c = \text{concentração molar.}$$

Para partículas esféricas podemos calcular o raio (r) pela fórmula

$$r = \frac{k T}{6 \pi \eta D} \quad (\text{Fórmula 15.})$$

Um fator que ainda não foi considerado é a solvação das partículas pela aproximação e imobilização parcial de dipolos do solvente. Este fator vai influir sobre a medida da viscosidade (η) e diminui com a redução do potencial electro-

cinético (ζ), como por exemplo ao aproximar-se do ponto iso-eléctrico, ou com um aumento da força iônica (μ) quando há substituição dos dipolos pelos ions de carga única.

Pode-se deduzir que a mobilidade electroforética depende de inúmeros factores e que as fórmulas citadas servem apenas de base para a interpretação qualitativa das relações entre a constituição da superfície e o tamanho da partícula com o seu movimento num campo eléctrico. O único dado quantitativo que nós podemos obter com facilidades pelas observações electroforéticas é a mobilidade aparente (u_A).

$$u_A = u - u_R$$

onde (u_R) é o efeito ralentador da nuvem de ions e dipolos que circundam a partícula. Este efeito deve desaparecer no ponto iso-eléctrico, e as determinações da mobilidade na região iso-eléctrica darão provavelmente valores que se aproximam mais da fórmula calculada. Entretanto, a carga (q) é muito pequena na região iso-eléctrica e o movimento é tão lento que as determinações podem ficar prejudicadas pelo tempo demorado de observação.

III) MÉTODO ELECTROFORÉTICO

a) *Descrição geral do aparelho*

O equipamento electroforético consiste essencialmente de uma célula transparente, colocada entre dois pólos de um campo eléctrico, e de um sistema óptico para a observação do movimento das substâncias na célula. Esta célula tem a forma de um tubo de "U" e é de corte rectangular para permitir a observação e facilitar a eliminação do calor de Joule produzido pela passagem da corrente na solução. Várias secções que deslizam sobre faces esmerilhadas subdividem a célula permitindo a separação e isolamento das várias partes. Estamos trabalhando com 4 jogos de células:

- I — Célula micro de 2 ml, para uso analítico.
- II — Célula semimicro de 11 ml, para uso analítico e preparativo.
- III — Célula semimacro de 75 ml, para uso preparativo.
- IV — Célula macro de 150 ml, para uso preparativo.

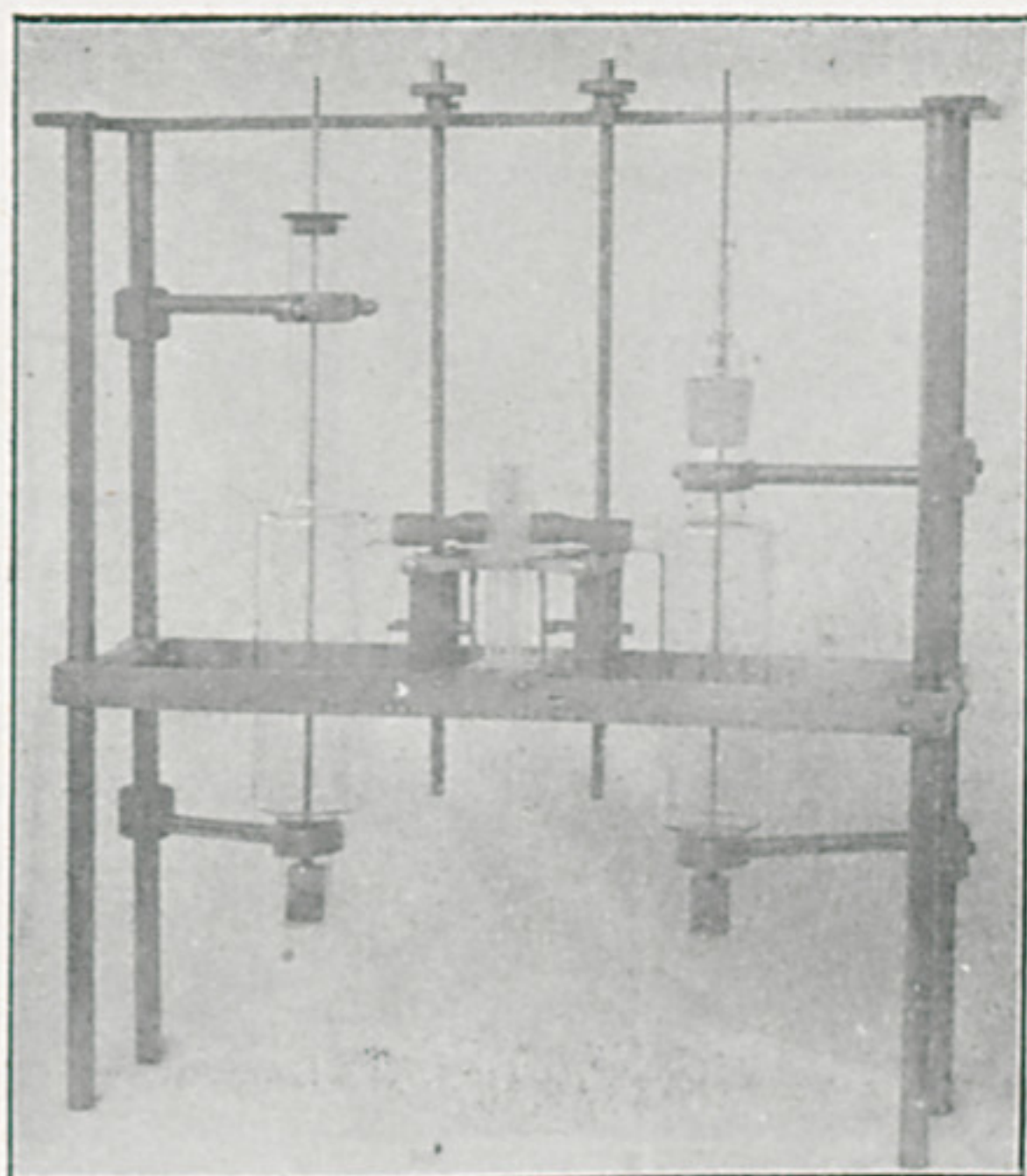


FIGURA 1
Célula micro

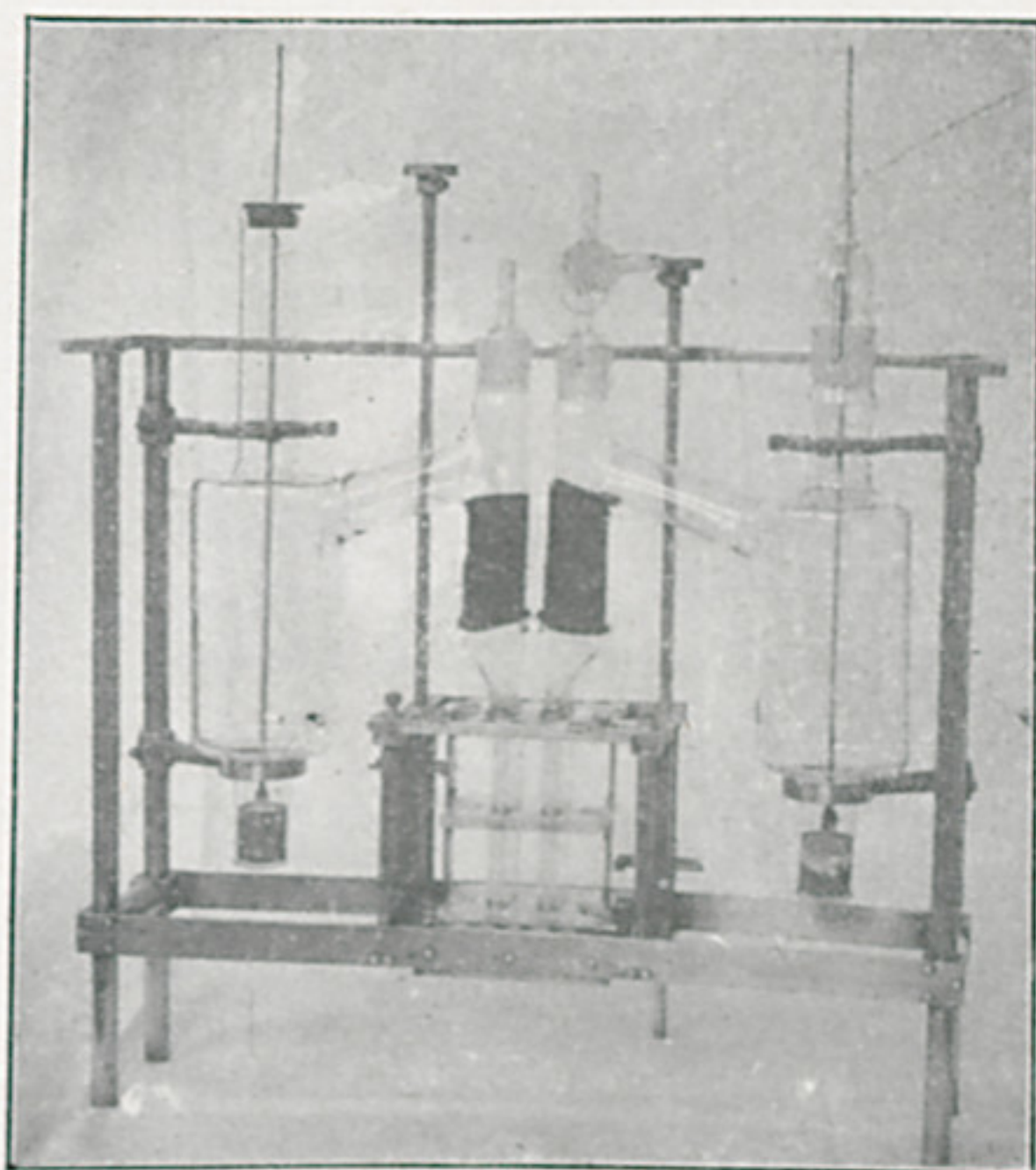


FIGURA 2
Célula semimicro

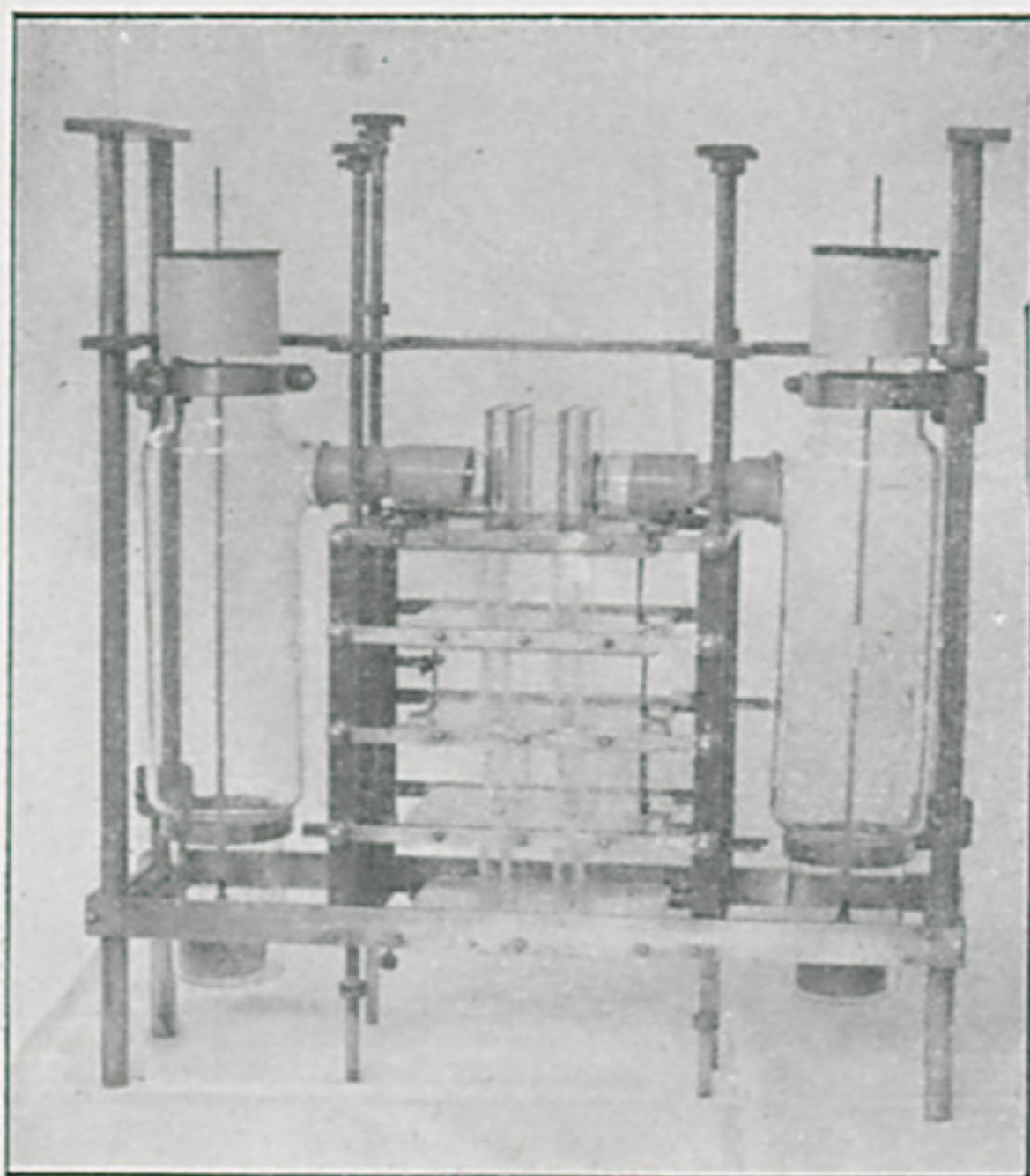


FIGURA 3
Célula macro

Os vasos grandes, de cada lado da célula, contêm os electrodios de prata e cloreto de prata numa solução de cloreto de potássio para evitar a polarização. O nosso aparelho (fabricado pela Klett Manufacturing Co. New York, U.S.A.) inclui ainda:

- 1) O banco óptico.
- 2) A lâmpada de mercúrio.
- 3) O tanque para o banho de temperatura constante.
- 4) A lente "Schlieren".
- 5) O conjunto frigorífico, com serpentina de resfriamento, agitador, termoregulador de mercúrio, e relé electrónico.
- 6) A seringa sincronizada.
- 7) A máquina fotográfica, com objetiva, fecho da objetiva, lâmina horizontal, lâmina inclinada, diafragmas, tubo óptico, lente cilíndrica, vidro fôsko, e chassis.

b) *Instalações mecânicas*

O aparelho é montado sobre dois trilhos de aço de 16 cm, com um comprimento de 6 m e uma distância de 20 cm entre os trilhos. A fonte de luz é uma lâmpada de 100 watt, tipo H 4, com um arco de mercúrio de 1,5 x 25 mm. A lente "Schlieren" de 10 cm tem uma distância focal de 90 cm e forma o lado externo de uma das janelas do termostato, os outros lados sendo constituídos por vidros planos que não devem apresentar defeitos ópticos. Estas janelas têm que ser duplas para evitar seu embaçamento pela deposição da humidade atmosférica. Conserva-se o espaço entre as partes da janela isento de vapor de água pela passagem de ar seco ou por meio de vácuo. Para evitar o embaçamento por fora pode-se usar um jacto de ar quente que impinge sobre as faces externas das janelas. Frizamos a importância deste ponto, pois é imprescindível para a obtenção dos perfis que as lentes e janelas estejam perfeitamente claras, transparentes e límpidas.

A lâmina horizontal para observações pelo método de Longsworth consiste numa chapa de metal que se pode mover verticalmente por meio de uma engrenagem cônica e um eixo que passa em baixo da máquina fotográfica até outra engrenagem que liga com um motor ao lado esquerdo do vidro fôsko. O mesmo motor inflige um movimento horizontal ao plano do vidro fôsko e da chapa fotográfica, sincronizando assim os dois movimentos. A objetiva da máquina fotográfica é uma lente de 5 cm com uma distância focal de 90 cm. Em frente da objetiva há um fecho de sector, movido por um motor sincronizado, e um disco com 6 aberturas diferentes que, segundo Longsworth, tem a vantagem de eliminar todos os raios luminosos que não fazem parte da faixa principal. No método de Philpot-Svensson usa-se sempre a abertura circular. A lente cilíndrica que tem uma distância focal de 40 cm encontra-se dentro do tubo óptico e costuma ser usada com a curvatura virada para o lado do vidro fôsko; a sua posição é ajustável na direção do eixo óptico da máquina fotográfica para permitir a focalização, e ela pode girar em redor de um eixo vertical na sua extremidade esquerda, ligado a um parafuso externo, para ser retirado do caminho óptico nas observações pelos métodos de Longsworth e de Lamm. A lâmina

inclinada, a fenda inclinada e o fio inclinado, para uso nas observações com a lente cilíndrica, são postas bem em frente ao fecho da objetiva.



FIGURA 4
Lâmina inclinada



FIGURA 5
Fenda inclinada

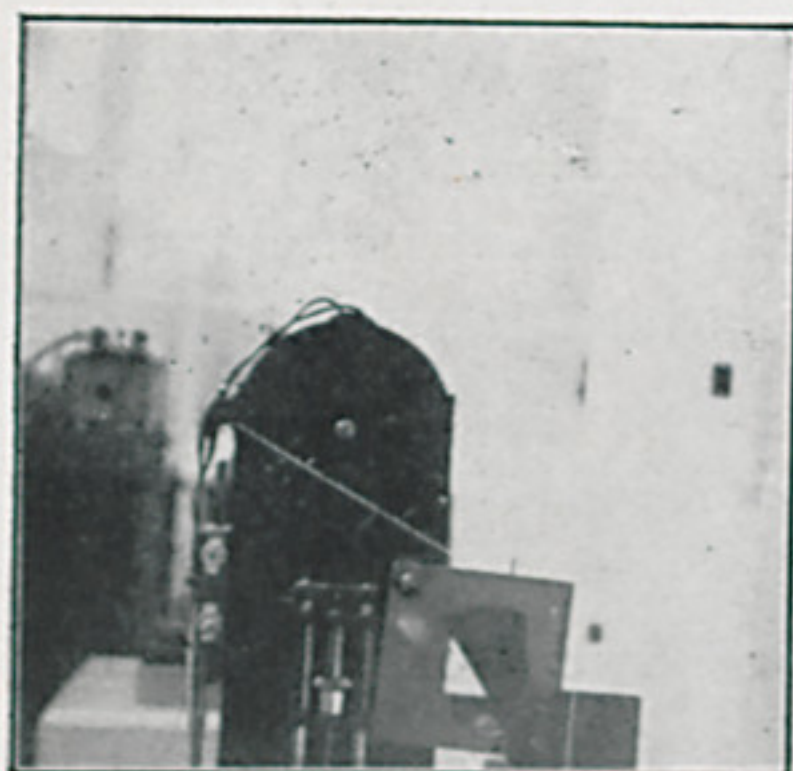


FIGURA 6
Fio inclinado

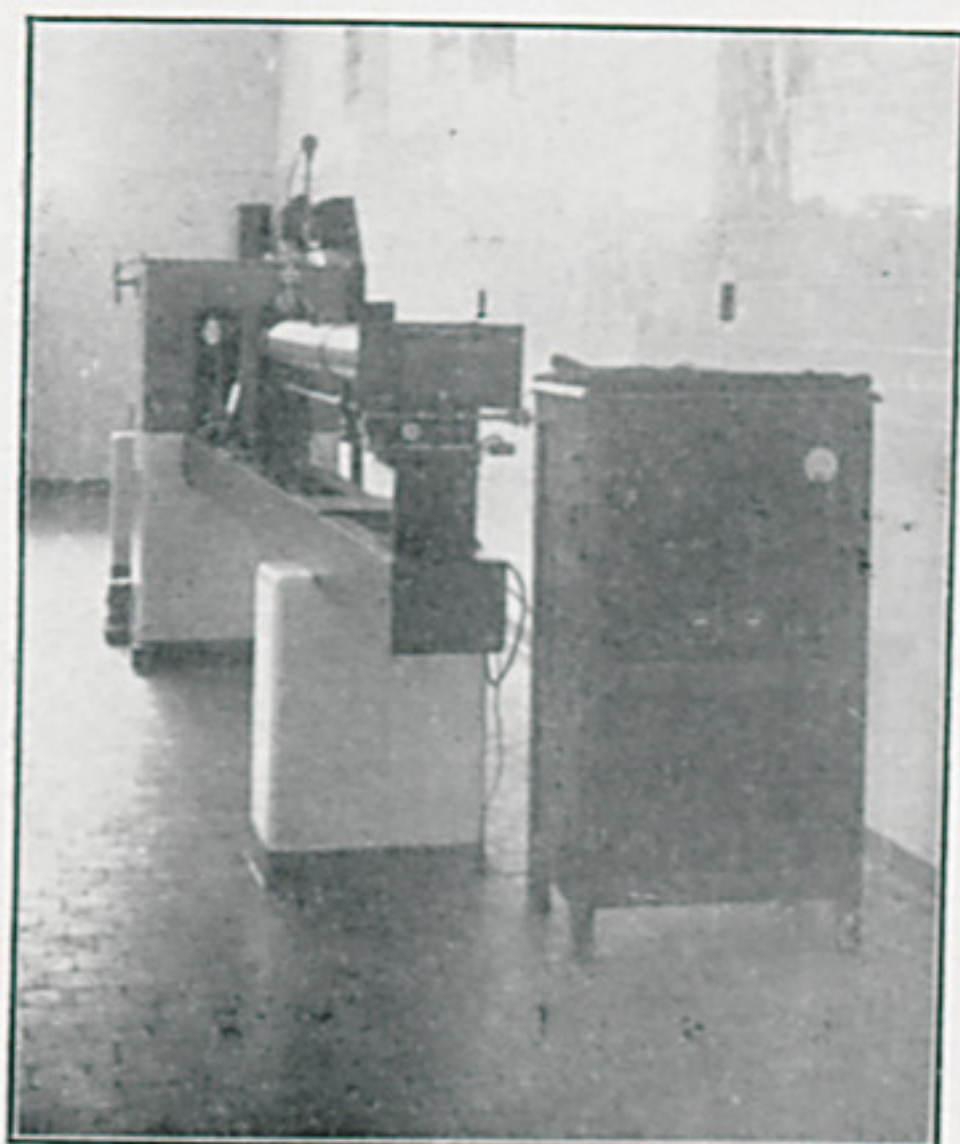


FIGURA 7
Vista geral do aparelho do lado da fotografia.

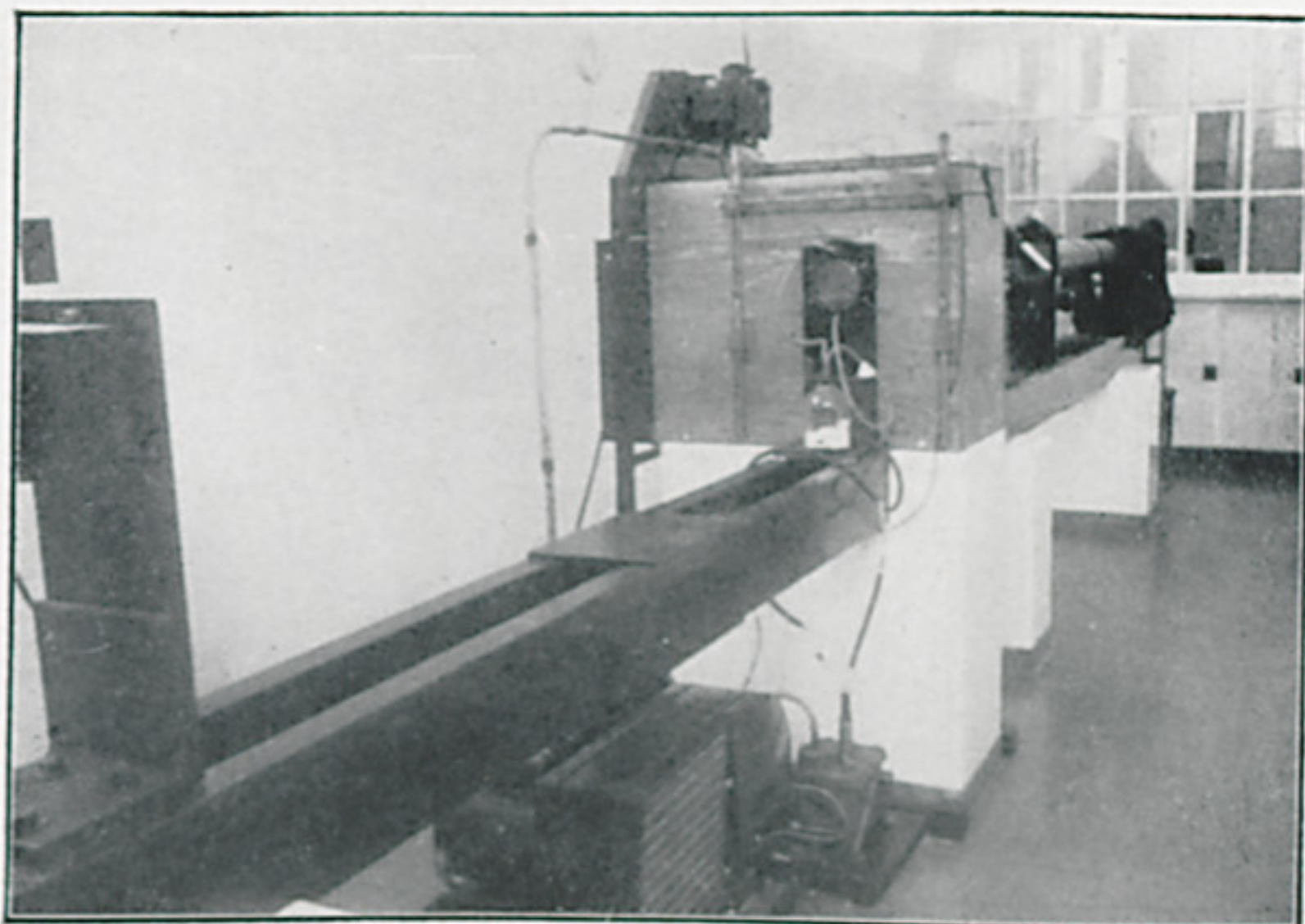


FIGURA 8
Vista geral do aparelho do lado da iluminação

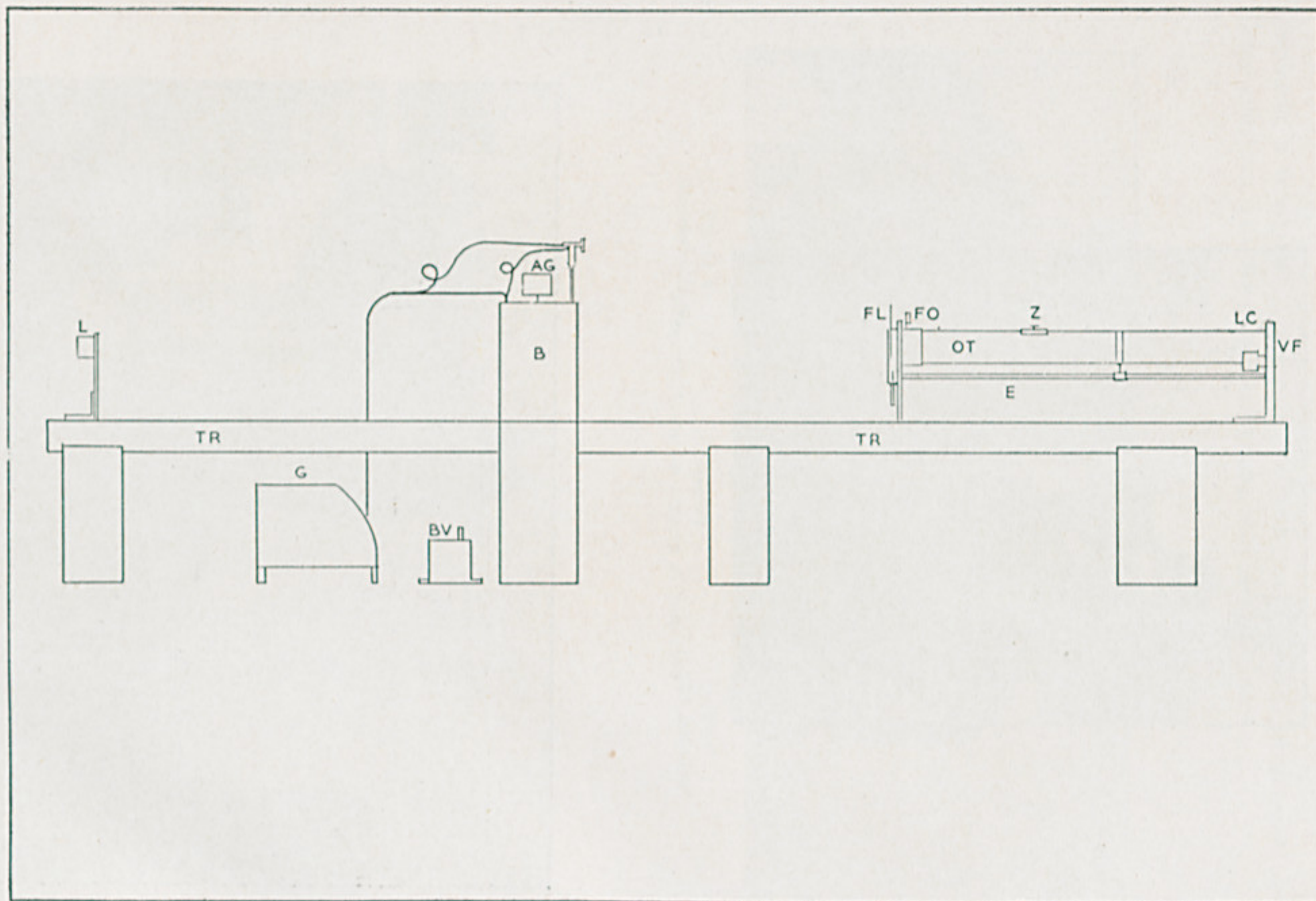


FIGURA 9
Esquema do aparelho de electroforese

ESCALA 1:40

c) *Ligações eléctricas*

As instalações eléctricas consistem no transformador (TL) que alimenta a lâmpada (L) de mercúrio, na bomba de vácuo (BV) para as janelas do banho, no termoregulador e relé (TG) para a máquina frigorífica (G), no agitador (AG) do banho, no motor da seringa sincronizada (SS), no motor do fecho da objetiva (FO), no motor da lâmina e chapa móvel (LC), no relógio eléctrico (R) e no retificador da corrente (RC) que fornece a corrente contínua para a célula através de uma série de resistências e medidores que servem para regular e medir a voltagem e a amperagem do campo eléctrico. Todas as chaves, interruptores, reguladores e instrumentos estão reunidos num quadro de contróle.

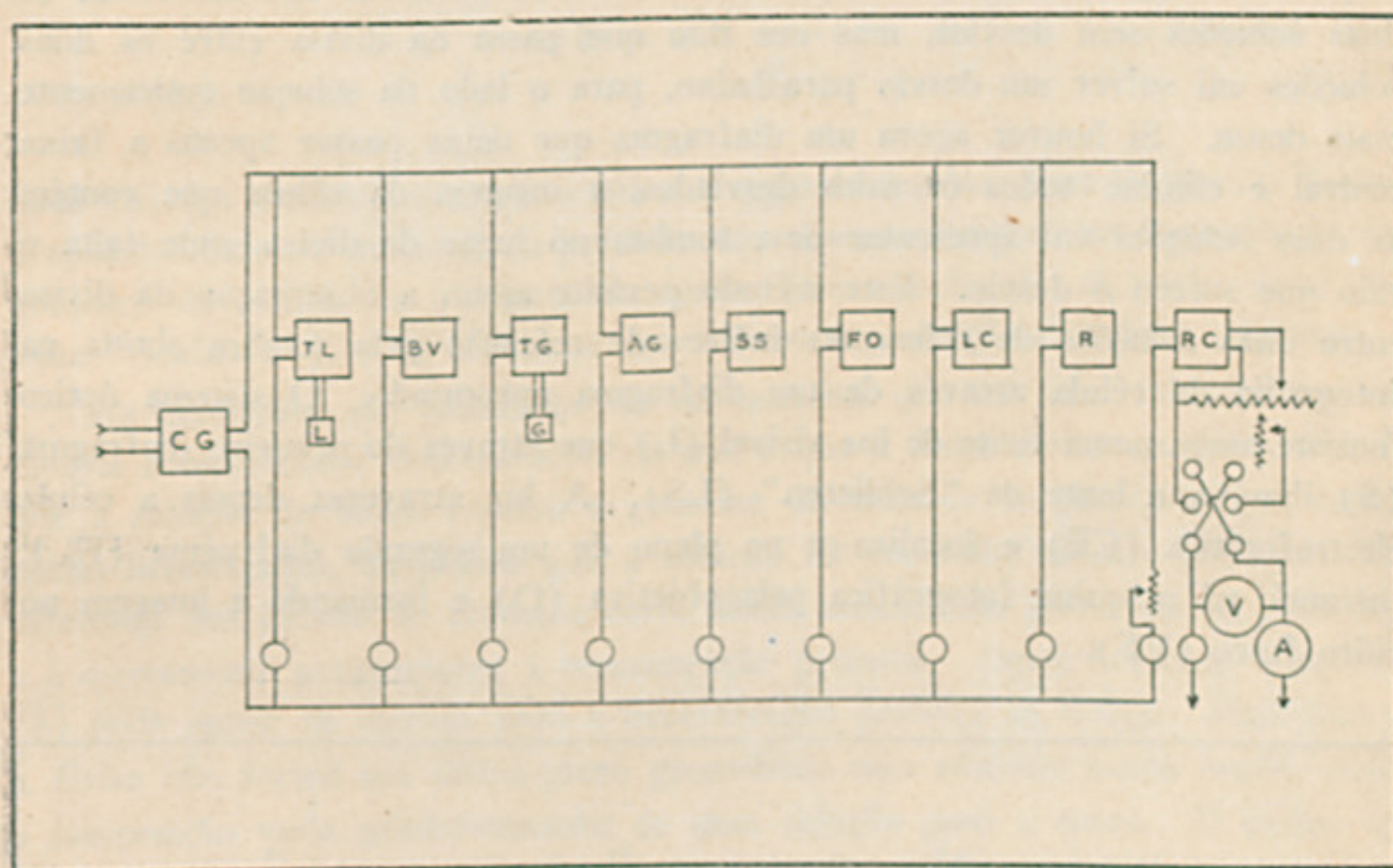


FIGURA 10
Esquema das ligações eléctricas

d) *Sistema óptico*

1 - Formação das imagens.

Quando se trata de observar a migração de um colóide opaco ou colorido, o sistema óptico consiste apenas numa fonte de luz e num condensador que reproduz a imagem da célula electroforética sem aberrações no plano do vidro fosco. O caminho percorrido pela imagem da divisa no vidro fosco num determinado tempo, dividido pelo fator do aumento do sistema óptico, representa a velocidade daquela divisa na célula electroforética.

Quando se trata, entretanto, de soluções incolores como por exemplo de soluções de proteínas plasmáticas, a observação do movimento das divisas torna-se mais complicada. Svedberg e Scott utilizaram a absorpção dos raios de ultravioleta pelas soluções proteicas, trabalhando com células e lentes de quartzo; este processo foi mais tarde suplantado pelos métodos de Tiselius, Longsworth, Philpot, Svensson e Lamm que usaram as ondas do espectro visível, aproveitando a diferença de índice de refração que existe entre duas soluções proteicas diferentes. O método de Tiselius que utilizou dois princípios de Foucault e a sua aplicação no processo das "Schlieren" de Toepler baseia-se na seguinte observação:

Imaginemos uma solução proteica em contacto com uma solução diferente e que tenha um índice de refração menor. Raios paralelos vão atravessar as duas soluções sem desvios, mas um raio que passa na divisa entre as duas soluções vai sofrer um desvio para baixo, para o lado da solução opticamente mais densa. Si houver agora um diafragma que deixe passar apenas a faixa central e elimine todos os raios desviados, a imagem da célula que contém as duas soluções vai apresentar uma sombra no lugar da divisa onde falta o raio que sofreu o desvio. Este método permite assim a observação da divisa entre duas soluções de diferentes índices de refração pela sombra obtida na fotografia da célula através de um diafragma apropriado. O sistema óptico consiste assim numa fonte de luz visível (L) que através do primeiro diafragma (S) ilumina a lente de "Schlieren" (LS). A luz atravessa depois a célula electroforética (CE) e focaliza-se no plano de um segundo diafragma (FL), entrando na máquina fotográfica pela objetiva (O) e formando a imagem no vidro fosco (VF).

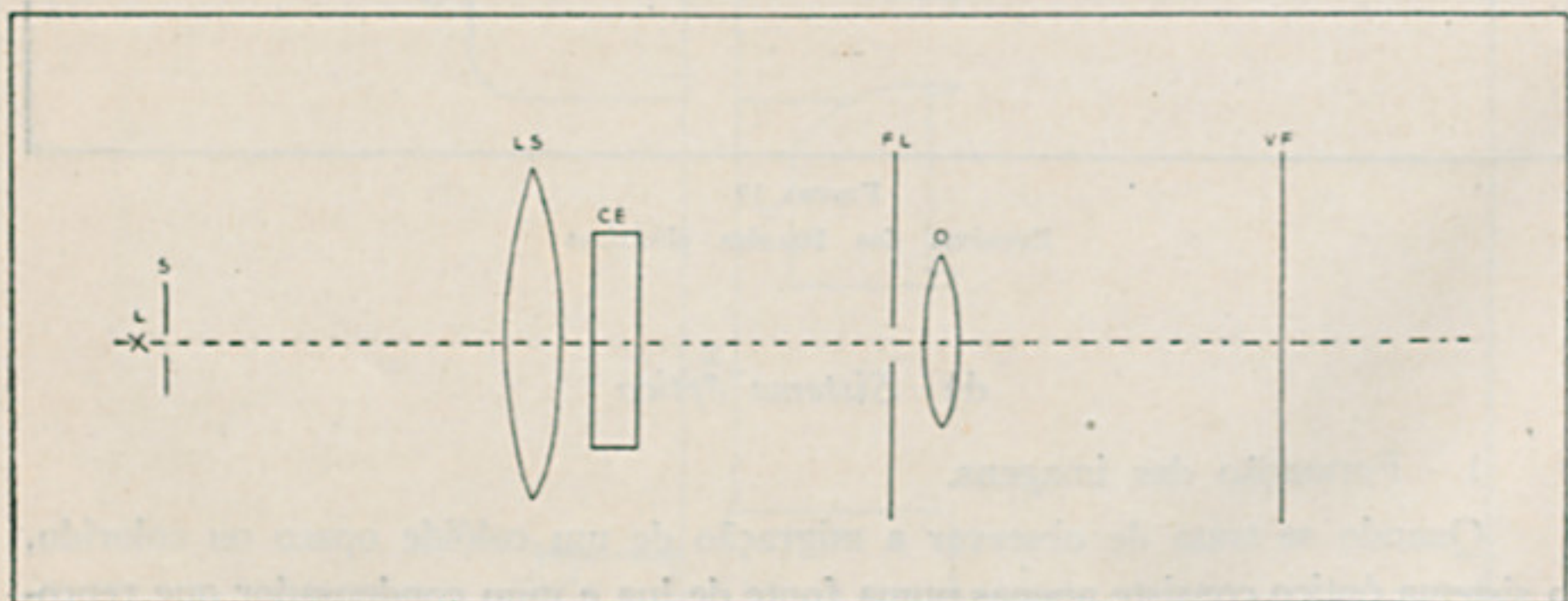


FIGURA 11

Quando a célula contém uma solução transparente e ópticamente homogênea, toda luz que passa pela célula atravessa o segundo diafragma e forma

uma imagem completamente iluminada da parte central da célula. Mas si a célula contiver dois líquidos de índices de refração diferentes que se tocam na linha indicada (f), a luz que entra na divisa (superfície de contacto) entre as duas soluções vai sofrer um desvio para o lado do meio opticamente mais denso. Como este se encontra geralmente em baixo, o desvio vai ser para baixo e os raios de luz que sofreram esta refração vão cair fora da segunda fenda. O lugar da divisa vai então ser marcado por uma faixa escura na imagem iluminada da célula sobre o vidro fosco. O desvio que a luz sofre depende da grossura da célula (a) e da variação do índice de refração (n) com a altura (h) da camada de líquido na célula. Medindo o desvio vertical (δ) no plano da segunda fenda, temos

$$\delta = a \cdot b \frac{dn}{dh} \quad (\text{Fórmula 16.})$$

onde (b) é a distância entre a célula e a segunda fenda. Esta expressão limita a applicabilidade do método, e a precisão das observações está na dependência da grossura da célula, da distância da fenda (em função da distância focal da lente "Schlieren"), e da diferença dos índices de refração das duas soluções.

As condições são escolhidas de tal maneira que as duas soluções tem a mesma composição e concentração de sais e que a única diferença entre elas é que a solução de baixo contém a proteína ou mistura de proteínas que estão sendo investigadas, enquanto que a solução de cima não contém proteína. A diferença dos índices de refração corre assim unicamente por conta da proteína e é diretamente proporcional á concentração proteica. Desta maneira, o desvio (δ) pode servir de medida para a concentração proteica na divisa. Entretanto, a divisa não forma um único plano geométrico mas consiste numa região onde a composição varia gradativamente de uma solução para a outra. O índice de refração nesta região acompanha estas mudanças contínuas conforme a altura na célula; a relação dn/dh vai assim variar de zero até um máximo voltando novamente ao zero, para cada divisa.

Como todos os raios que sofrem um desvio em virtude de refrações na zona de contacto entre duas soluções vão passar em baixo da faixa normal de luz que atravessa a segunda fenda sem desvio, podemos substituir esta fenda por uma lâmina afiada. Conforme a posição desta lâmina vamos eliminar uma parte dos raios desviados e obter como imagem uma faixa escura mais ou menos larga. Com a lâmina fóra do campo toda a luz cai sobre o vidro fosco dando uma imagem completa da célula sem sombras. Levantando a lâmina até cortar o raio de maior desvio, vamos obter na imagem uma linha preta no

lugar da divisa entre as duas soluções. Esta linha preta vai se alargar com a aproximação da lâmina até a faixa normal da luz. A sombra que assim aparece na imagem recebeu o nome de faixa "Schlieren" — nome adaptado do trabalho original de Toepler e conservado em todas as linguas e indicando uma interrupção da continuidade óptica. A largura da faixa "Schlieren" está assim na dependência da posição da lâmina. Resumindo todas estas imagens sucessivas vamos obter uma figura geométrica que no caso ideal representa a área da curva de Gauss.

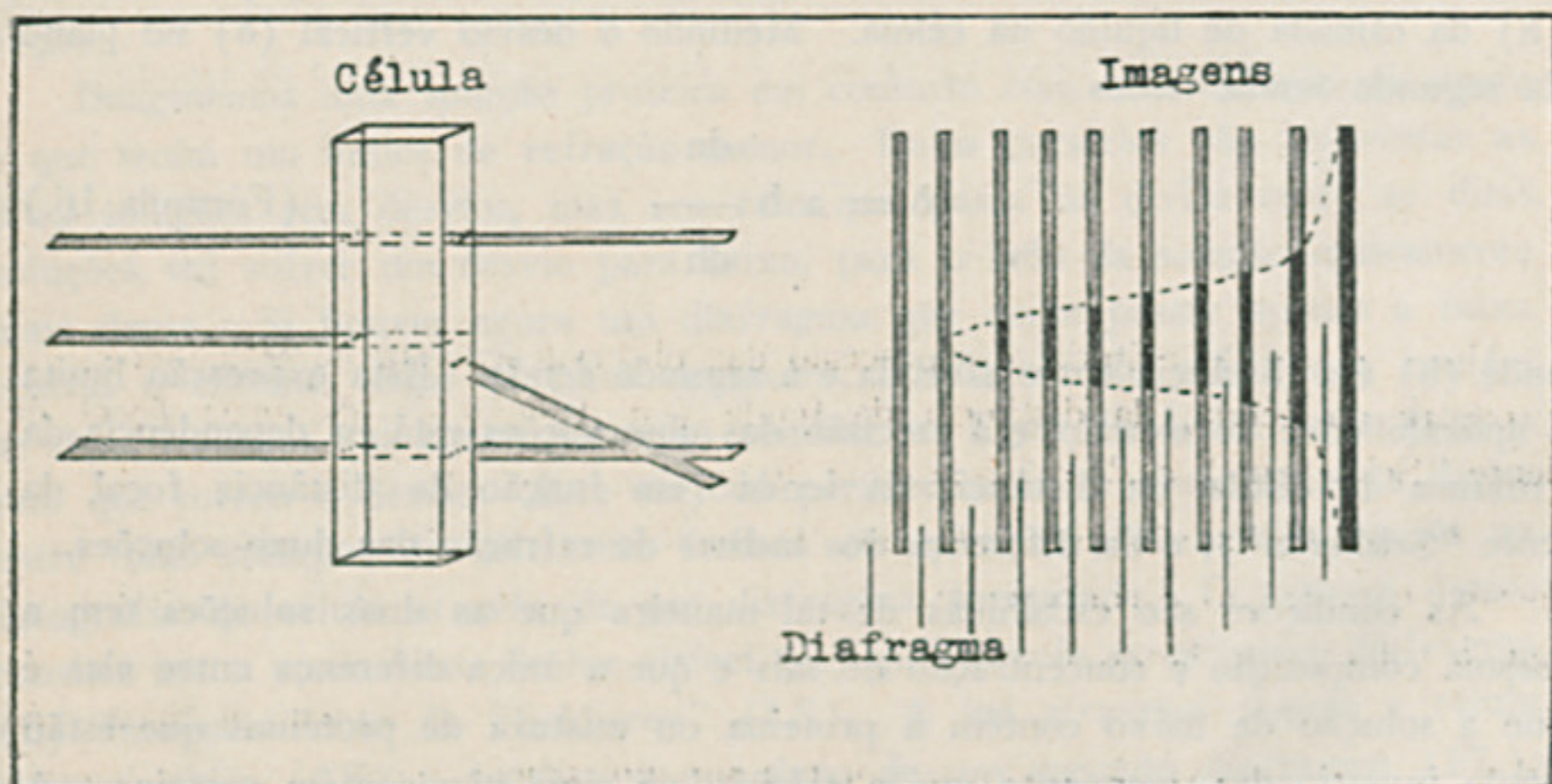


FIGURA 12

Por razões práticas costuma-se reproduzir estas imagens viradas por um ângulo de 90° , da maneira que a maior extensão lateral representa a altura da curva.

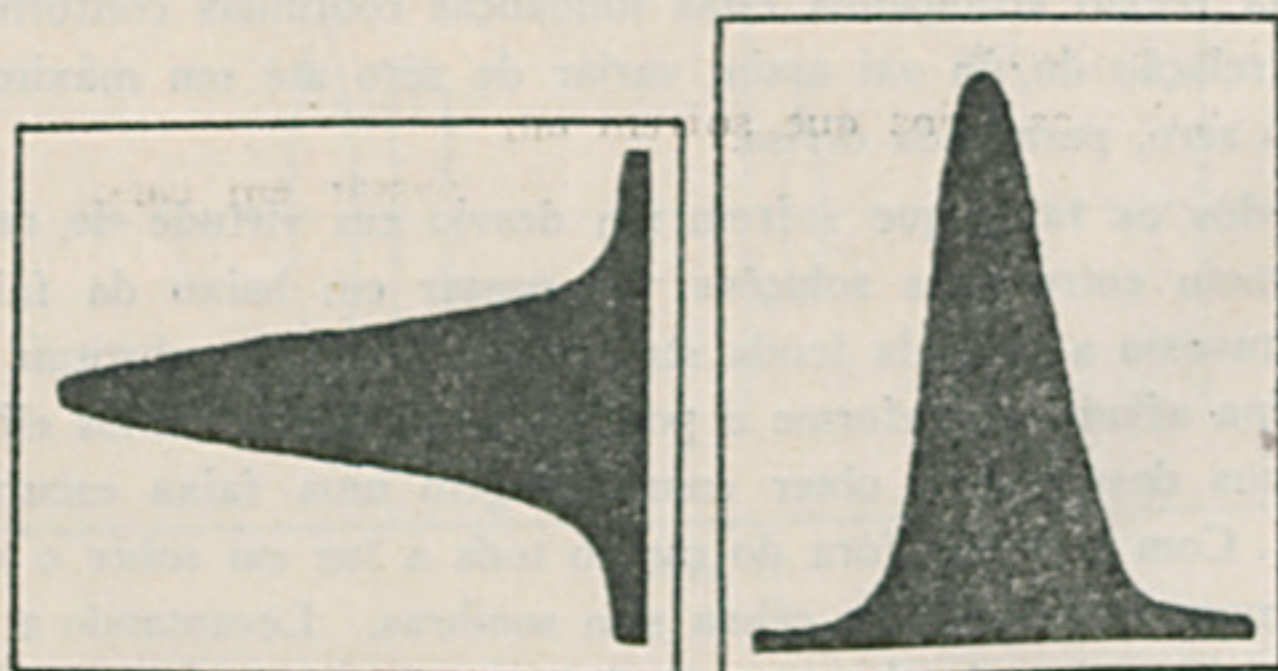


FIGURA 13

Esta altura depende da maior refração sofrida que por sua vez é uma função da concentração proteica. A maneira de tirar conclusões numéricas da forma desta curva, ou de qualquer outra representação dos desvios que a luz sofre na sua passagem através da célula, caracteriza os métodos mais usados na interpretação das observações electroforéticas.

2 — Método "Schlieren scanning" de Longsworth. (Exploração da interrupção de continuidade óptica.

Em combinação com o levantamento vertical da lâmina, Longsworth usa um movimento horizontal simultâneo da chapa fotográfica, colocada no lugar do vidro fosco, que vai somando as várias imagens sucessivas. A área assim obtida representa a soma de todos os desvios sofridos pela luz na região das duas soluções da célula. A relação entre o desvio e o índice de refração na divisa das duas soluções foi dada na fórmula 16. A área total é proporcional á soma de todos estes desvios:

$$\int \delta \, dh = \frac{a \, b}{g} \int \frac{dn}{dh} \, dh = \frac{a \, b}{g} (n_2 - n_1) \quad (\text{Fórmula 17.})$$

onde (g) é a constante de proporcionalidade.

$$g = \frac{1}{j \, m} \quad \text{sendo}$$

j = relação do movimento da chapa com
o movimento da lâmina
m = fator de aumento da máquina foto-
gráfica

A diferença de índice de refração ($n_2 - n_1$) é proporcional á concentração (c) da substância (proteína) dissolvida na solução no fundo da célula. Si (K) = incremento específico de refração, a saber a diferença de índice de refração por unidade de substância dissolvida, nos temos

$$c \, K = n_2 - n_1$$

Substituindo este valor na fórmula 17. vamos obter

$$\int \delta \, dh = \frac{a \, b}{g} c \, K$$

$$c = \frac{g}{a \, b \, K} \int \delta \, dh \quad (\text{Fórmula 18.})$$

Quando temos uma mistura de proteínas, os vários componentes vão caminhar com velocidades diferentes, conforme as cargas eléctricas dos coloides no pH da experiência. Vamos tomar como exemplo o caso de 3 proteínas de pontos iso-eléctricos diferentes, mas todos abaixo do pH da experiência, de tal maneira que as proteínas tem cargas negativas e vão caminhar em direção ao anódio.

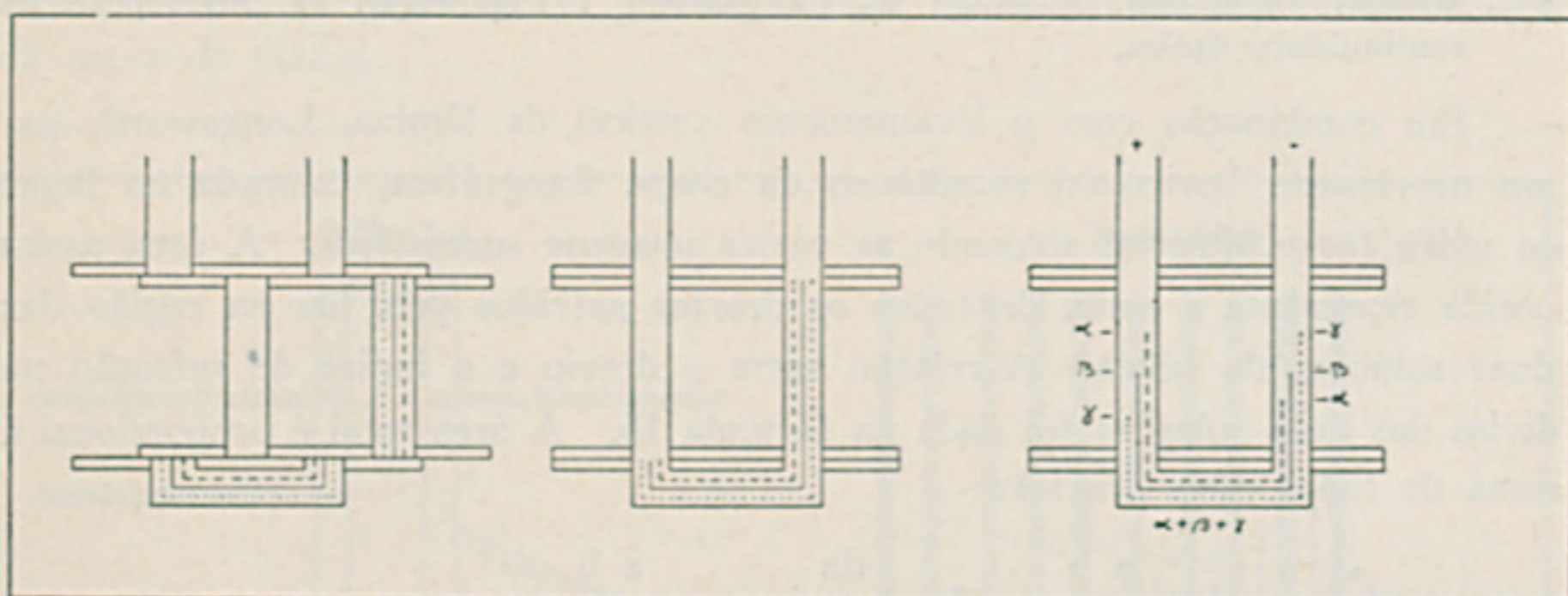


FIGURA 14

Si as cargas destas proteínas estão na relação $\alpha > \beta > \gamma$ vamos obter tres curvas, com tres picos que correspondem ás tres divisas entre as soluções ($\alpha + \beta + \gamma$] contra ($\alpha + \beta$), ($\alpha + \beta$) contra (α), e (α) contra o tampão. No lado catódico do tubo, onde as proteínas vão fugir do catódio, existem as mesmas condições e as mesmas imagens. Para diferenciar as imagens, chamamos o lado anódico onde as proteínas caminham para cima, de lado ascendente (lado A), e o outro lado, de lado descendente (lado D). As duas imagens, entretanto, não são estritamente idênticas, pois si no lado ascendente as proteínas estão entrando no tampão, no lado descendente as proteínas vão caminhar para dentro da solução proteica que tem uma viscosidade e concentração iônica maior que o tampão, em virtude da contribuição dos ions proteicos. Na preparação da solução proteica para a electroforese, a proteína é colocada em diálise contra a solução tampão até estabelecimento de equilíbrio iônico entre as duas soluções. As concentrações electrolíticas das duas soluções, entretanto, nunca são idênticas em virtude do equilíbrio de Donnan. Com estas diferenças de concentração aparecem outras divisas que não são provocadas por proteínas, e que devem ser eliminadas ou afastadas das divisas proteicas pela correção das concentrações electrolíticas ou pela escolha de condições nas quais a diferença da velocidade de migração das divisas é bastante grande para permitir a separação entre as divisas proteicas e as outras.

O afastamento lateral, na direção da migração, de cada pico de curva, da posição original da divisa inicial entre as duas soluções indica a mobilidade, e a área em baixo da curva mede a concentração daquela proteína que provocou a formação da respectiva divisa.

O método de Longsworth é simples e rápido e pode ser aplicado para medir pequenas diferenças de concentração, pois a altura dos picos da curva pode variar conforme a velocidade relativa entre a lâmina e a chapa.

3 — Método da escala de Lamm.

Neste método não há fenda, nem lâmina, mas unicamente uma escala transparente que se coloca perto da célula no caminho dos raios que vêm da fonte de luz. A escala é fotografada através da célula, e as suas divisões vão sofrer desvios em virtude das diferentes refrações na célula. Comparando as divisões desviadas, como aparecem na fotografia, com as posições originais, regularmente espaçadas, da escala, temos uma medida da refração em cada ponto da célula. Um gráfico destes desvios contra a altura da célula forma uma curva que representa a posição das divisas e as concentrações das substâncias que provocaram estas diferenças.

O método de Lamm fornece resultados quantitativos muito exatos e serve para observar divisas bem fracas onde as diferenças de concentração são pequenas, mas o trabalho de avaliar as curvas ponto por ponto, a partir dos desvios sofridos pelas divisões da escala, é extremamente penoso e exige muito tempo. O maior inconveniente deste método, e também do de Longsworth, é o fato que a migração e a formação das divisas não podem ser observadas diretamente e que é preciso justapor várias fotografias, tiradas de tempo em tempo, para poder apreciar o progresso da separação das frações. Esta dificuldade foi completamente eliminada pelo método de Philpot-Svensson.

4 — Método de Philpot-Svensson.

O processo da formação das imagens neste método é puramente óptico, permitindo a observação direta e contínua do perfil electroforético sem a necessidade de movimentar lâminas ou chapas fotográficas. Ele se baseia numa combinação das "Schlieren" de Toepler com um processo de Thouvert que Philpot tinha usado para observação das divisas que se formam na ultracentrífuga. Svensson adaptou o método de Philpot às observações electroforéticas com a seguinte modificação: A imagem de Philpot representa uma área preta num fundo branco, enquanto Svensson obtem uma linha branca num fundo preto. Há ainda outra modificação que fornece uma linha preta num fundo branco. As respectivas vantagens destas modificações vão ser apontadas mais tarde. O

princípio geral do método é o seguinte: A faixa de luz depois de atravessar a célula, passa por uma fenda inclinada, colocada no lugar da lâmina horizontal de Longsworth, continuando pela objetiva da máquina fotográfica e por uma lente cilíndrica de eixo vertical que se encontra entre a objetiva e o vidro fosco.

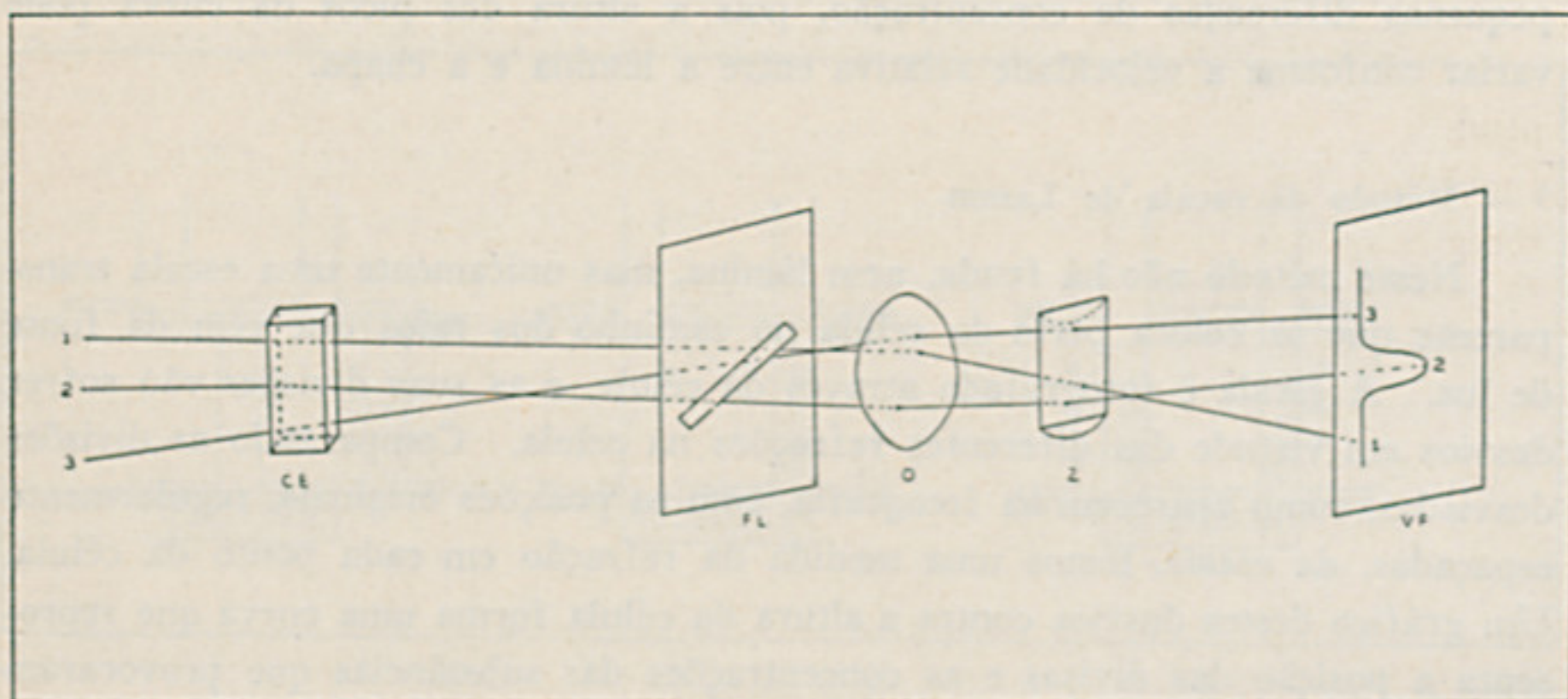


FIGURA 15

Os raios que vão atravessar a célula nos lugares onde não existem divisas, não sofrem desvios e vão formar uma linha vertical no vidro fosco. Porém os raios que são desviados pela refração nas divisas vão atravessar a fenda inclinada num ponto mais baixo e lateralmente deslocado, passando pela lente cilíndrica num ponto mais afastado do eixo e sofrendo porisso uma inflexão maior, caindo á direita da linha dos raios normais da imagem no vidro fosco. Quanto maior a refração na célula, tanto mais a imagem do raio desviado se afastará da linha da base dos raios normais não desviados. A imagem representa assim uma linha base e uma curva que corresponde á curva obtida pelos outros processos. Os cálculos são os mesmos como antes. O desvio de cada ponto é

$$\delta = a b \frac{dn}{dh}$$

e a área incluída entre a base e a curva de Gauss que representa as variações da concentração na divisa é

$$\int \delta dh = \frac{a b}{g} (n_2 - n_1)$$

A concentração de proteína que provocou esta diferença dos índices de refração é

$$c = \frac{g}{a b K} \int \delta \, dh$$

A constante de proporcionalidade (g) que no método de Longsworth depende das velocidades da lâmina e da chapa fotográfica, torna-se aqui uma função do ângulo (θ) da fenda inclinada e do fator do aumento da máquina fotográfica que inclui agora a lente cilíndrica.

$$g = \frac{1}{m \operatorname{tg} \theta}$$

$$c = \frac{1}{m a b K \operatorname{tg} \theta} \int \delta \, dh \quad (\text{Fórmula 19.})$$

Em geral, não há necessidade de determinar as constantes (m,a,b,) do aparelho porque as concentrações relativas dos componentes electroforéticos interessam mais que as quantidades absolutas; estas podem então ser calculadas facilmente a partir da concentração proteica total que se determina por dosagens químicas, de preferência pelo Micro-Kjeldahl. O incremento específico (K) é praticamente igual para todas as fracções proteicas do plasma, com exceção das lipo-proteínas. O valor médio de (K) para plasma humano é de 0,00185 por grama de proteína em cada 100 ml de solução para a linha D do espectro visível.

A fenda inclinada tem uma forma especial, inventada por Svensson para formar linhas finas e nítidas. A abertura da fenda é variável entre 0 — 5 mm, como também o ângulo (θ) da fenda com a vertical.

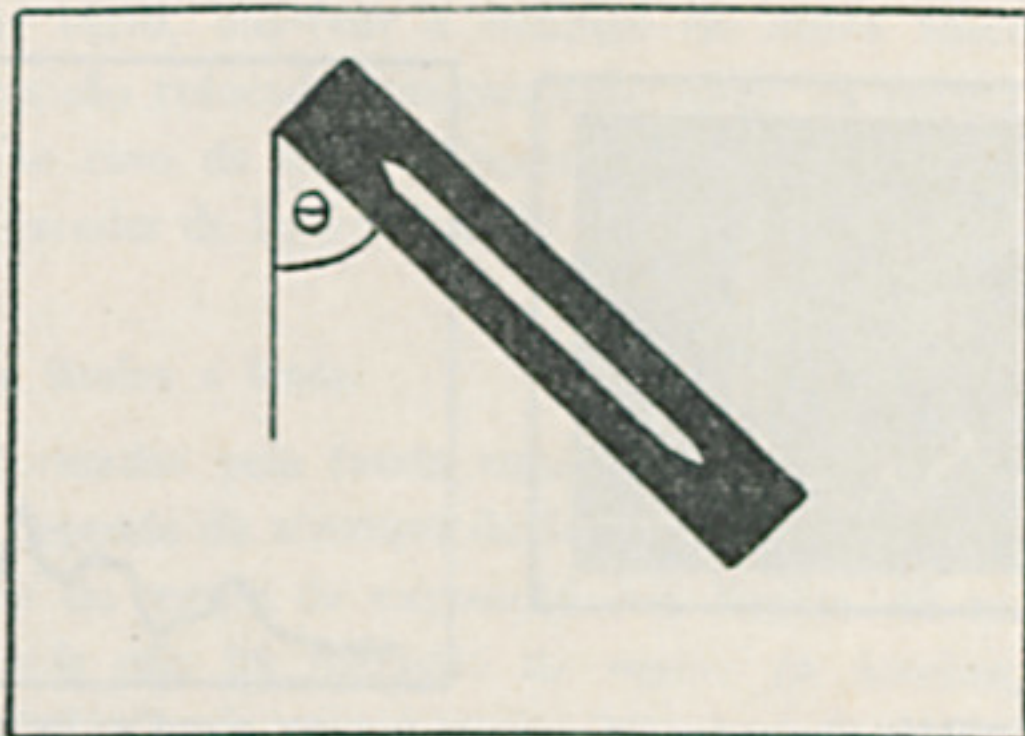
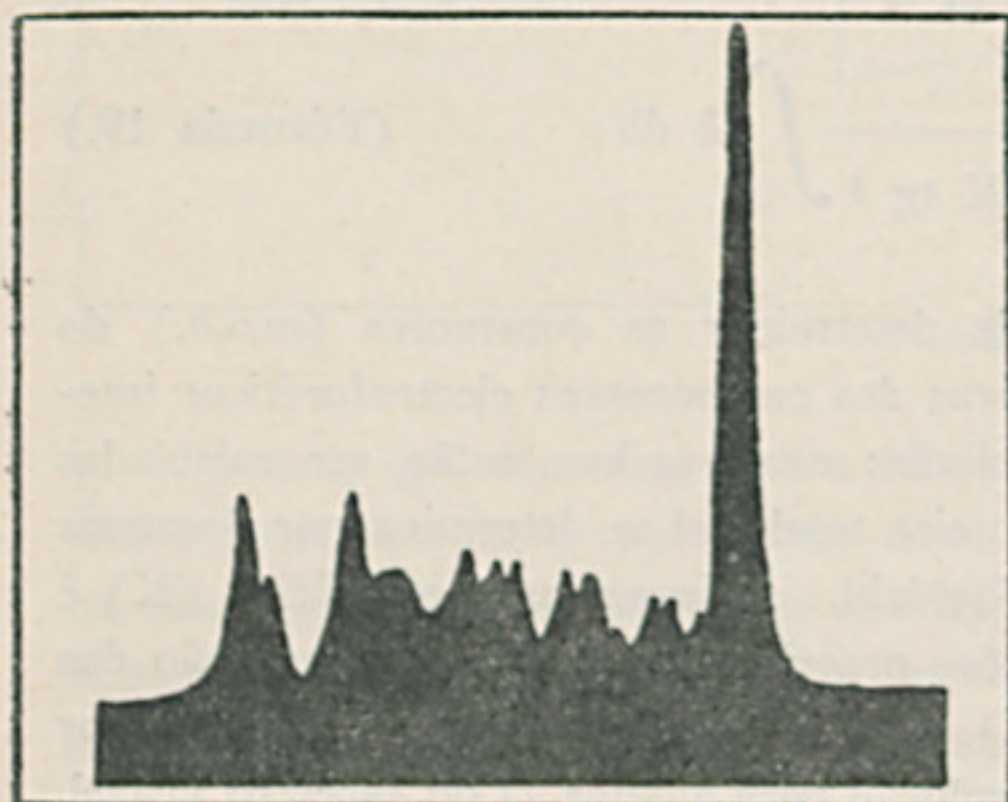


FIGURA 16

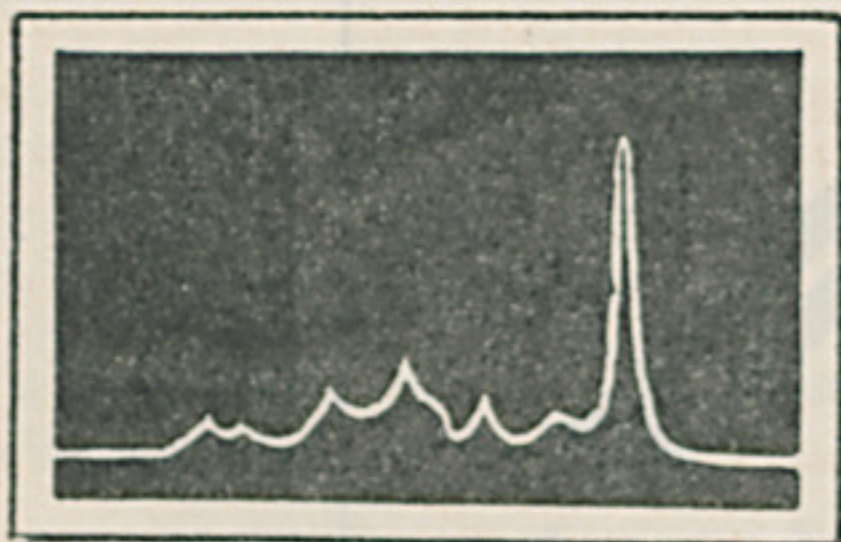
Colocando uma lâmina inclinada no lugar da fenda inclinada de tal maneira que os raios desviados para baixo são interceptados por esta lâmina, nós vamos obter como imagem uma área escura cujos contornos correspondem á linha branca obtida pela fenda. Colocando um fio inclinado no lugar da lâmina, a imagem vai ser uma linha preta num fundo claro. Estas variações encontram aplicações em alguns casos, mas o resultado é independente do método de obtenção do perfil electroforético. O mais recomendado é o método da fenda inclinada segundo Svensson que permite obter fotografias nítidas. Não há necessidade de usar chapas ou filmes, uma tira de papel fotográfico comum (Kodabromide) é suficiente, pois bastam alguns segundos de exposição durante os quais não há movimento perceptível do perfil electroforético.



Lâmina horizontal



Lâmina inclinada



Fenda inclinada



Fio inclinado

5 — Ajustamento do sistema óptico.

O sistema óptico deve ser construído do melhor material, com lentes bem corrigidas e com um mínimo de aberrações. O ajustamento do conjunto é muito importante e deve ser feito com todo o cuidado possível, obedecendo as seguintes recomendações gerais:

- 1) Retirar a célula do banho. Ajustar a posição da fonte de luz e da primeira fenda até formar uma imagem nítida de 25 mm de largura, no mínimo, no plano da segunda fenda.
- 2) Recolocar a célula, retirar a lente cilíndrica e a fenda inclinada. Ajustar a posição da objetiva da máquina fotográfica até formar uma imagem nítida da parte central da célula no vidro fosco. Recolocar a lente cilíndrica.
- 3) Colocar uma lâmina ou fenda horizontal no plano da fenda inclinada e ajustar a posição da lente cilíndrica até obter uma imagem nítida no vidro fosco.
- 4) Substituir a lâmina horizontal pela fenda inclinada e observar que a imagem forme uma linha vertical nítida.
- 5) Verificar a ausência de aberrações das lentes pelo seguinte processo:

Aberrações horizontais

Com a segunda fenda em posição horizontal e sem a lente cilíndrica, observar a imagem no vidro fosco de uma escala transparente de precisão que se coloca horizontalmente no lugar da célula no banho. As divergências das divisões da escala não devem exceder de 0,04 % em 30 mm.

Aberrações verticais

Com a segunda fenda em posição horizontal e bem aberta, e com a lente cilíndrica no lugar certo, observar a imagem no vidro fosco de uma escala transparente de precisão colocada verticalmente junto da segunda fenda, com as divisões paralelas ao eixo da lente cilíndrica. As divergências das divisões da escala não devem exceder de 0,05 % em 25 mm.

6 — Diferença entre lâmina e fenda.

As imagens formadas pela fenda consistem de uma linha mais ou menos fina cuja grossura depende da abertura da fenda. O centro desta linha é sempre fixo e não depende do tempo de exposição. A lâmina dá como imagem uma área bem nítida, pois não há difração na região da sombra, mas a posição dos contornos desta área varia com o tempo de exposição. Por isso é preferível,

em geral, trabalhar com a imagem linear e reservar a aplicação da lâmina para os casos onde a análise de dois picos muito próximos exige maior nitidez do perfil electroforético.

IV) TÉCNICA DO EXPERIMENTO ELECTROFORÉTICO

a) *Preparo do material*

Para obter uma velocidade electroforética constante é preciso evitar variações dos fatores que influenciam o movimento da proteína: a força do campo eléctrico, a viscosidade do meio, e a carga da proteína. Usamos nesta publicação a proteína como exemplo típico de material que se presta para investigações electroforéticas, mas as mesmas indicações são válidas para trabalhos com outros coloides ou substâncias ionizáveis em geral. A carga da proteína depende do pH e para assegurar a constância do meio, a solução proteica é dialisada contra uma solução tampão até estabelecimento do equilíbrio iônico. A mesma solução tampão é depois superposta na célula. O efeito de Donnan vai impedir um equilíbrio perfeito, mas este defeito pode ser corrigido parcialmente pela diluição da proteína dialisada com água destilada à razão de 0,05 ml de H_2O para cada ml de solução, ou pelo uso de um tampão 1,08 vezes mais concentrado para o líquido de superposição. O pH da experiência é escolhido de tal maneira que todas as frações da mistura proteica caminham na mesma direção, mas com velocidades diferentes. Para substâncias lábeis, usa-se o pH de maior estabilidade. Pode mesmo haver casos onde se recomendam duas ou mais determinações electroforéticas em valores diferentes de pH. A temperatura da experiência é geralmente entre 2 — 5.º C e tem que ser conservada constante durante toda a electroforese, com variações máximas de 1/10 de ºC. Escolha-se de preferência aquela temperatura onde as variações de densidade das soluções são mínimas, para evitar correntes de convecção e mudanças de viscosidade.

A escolha do tampão é muito importante pois a nitidez das curvas depende das condições nas divisas, onde as variações de condutibilidade devem ser insignificantes comparadas à condutibilidade total. Isto significa que a concentração proteica deve ser baixa em relação à concentração iônica do tampão para que não haja grande diferença entre as condutibilidades da solução proteica e da solução tampão. Também, as mobilidades das proteínas e dos ions do tampão não devem ser muito diferentes. Os melhores resultados são obtidos com tampões cujo anion tem peso molecular elevado, para as experiências na região alcalina das proteínas. Para as análises electroforéticas de plasmas e soros usamos um tampão de veronal sódico (di-etil-barbiturato de sódio) decinormal com 0,71 % de oxalato de sódio e ácido di-etil-barbitúrico 0,02 normal, dando um

pH de 8,6 e uma força iônica de 0,1. Não se recomenda uma força iônica maior de 0,2 para evitar uma potência elevada na célula que nunca deve suportar mais de 5 watt. A concentração proteica que pelas razões acima indicadas deve ser a mais baixa possível, fica na dependência do sistema óptico. Para análises de plasma ou soro pelo método de Philpot-Svensson usamos uma concentração em redor de 1,5 % de proteína, diluindo a solução dialisada com solução tampão até obter uma diferença de índice de refração entre proteína e tampão de 0,0030 que indica 1 — 2 % de proteína total na solução. Tendo o cuidado de eliminar ou afastar as falsas divisas que não são provocadas por proteínas, pode-se descobrir 0,05 mg de proteína por ml de solução.

b) *Diálise*

A solução proteica que se deseja submeter á electroforese é colocada num saquinho de papel celofane e dialisada contra um volume 50 vezes maior de solução tampão que se troca por nova solução 6 — 8 vezes durante o tempo de diálise. Na temperatura de 2 — 4°C e sem agitação, a diálise leva 3 — 4 dias, mas por meio de um agitador colocado dentro da proteína, este tempo pode ser encurtado para algumas horas apenas, especialmente quando a diálise se processa em temperatura ambiente. No caso de plasma, a solução tampão deve conter um anticoagulante para evitar a desnaturação do fibrinogênio. O progresso da diálise pode ser acompanhado por medidas conductométricas até que a condutibilidade da solução proteica atinge um valor estável. A solução dialisada é então diluída com mais solução tampão até o teor proteico desejado e centrifugada para ficar límpida.

c) *Preparo da célula*

Damos em seguida a descrição detalhada do processo de enchimento da célula micro, que pode servir de base para trabalhos com as células maiores. É de suma importância que as indicações sejam seguidas com todo o rigor possível, pois o mínimo lapso pode inutilizar todo o material. A célula micro consiste nas seguintes partes: O fundo do tubo de "U", o centro do tubo de "U", a parte superior do tubo de "U", o vaso anódico, e o vaso catódico, com os respectivos electródios. O seguinte esquema indica os passos a seguir:

a) Passar vaselina ou outra graxa semi-sólida nas faces esmerilhadas do tubo de "U" até que cada face deslize com facilidade sobre a face oposta. Retirar o excesso de graxa, evitando a todo custo que se suje o canal interno do tubo de "U".

b) Colocar o fundo e o centro do tubo de "U" no suporte e enchê-los com a solução proteica dialisada, diluída e centrifugada, até alguns milímetros acima da face do fundo.

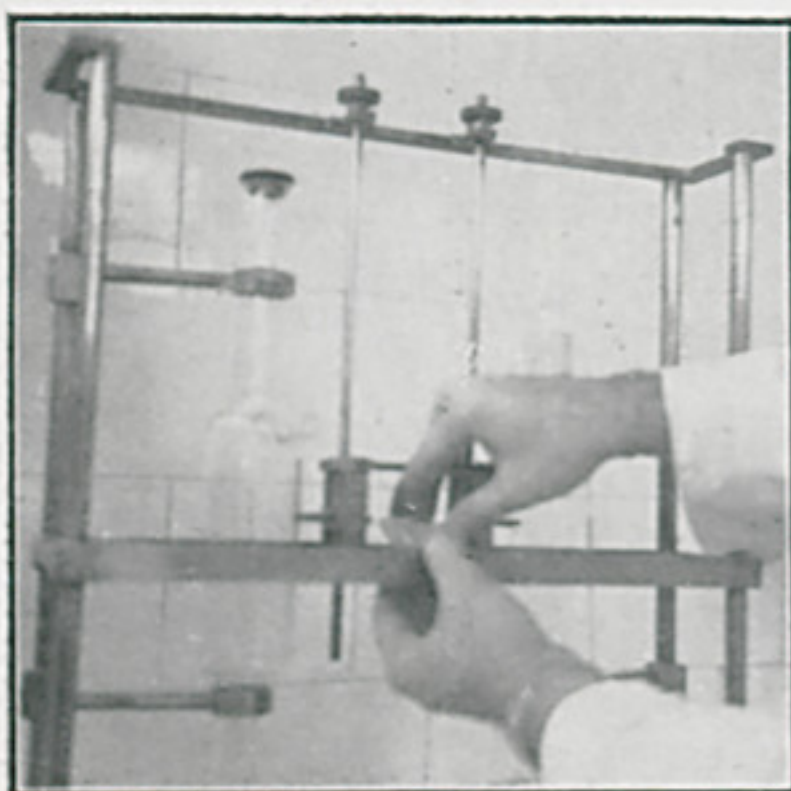


FIGURA 18
Colocando o fundo

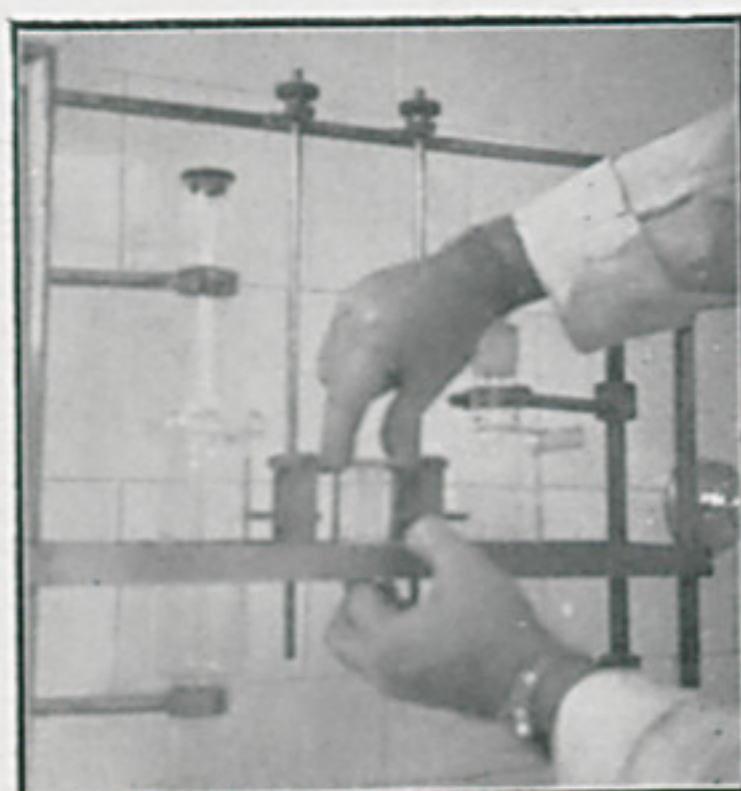


FIGURA 19
Colocando o centro

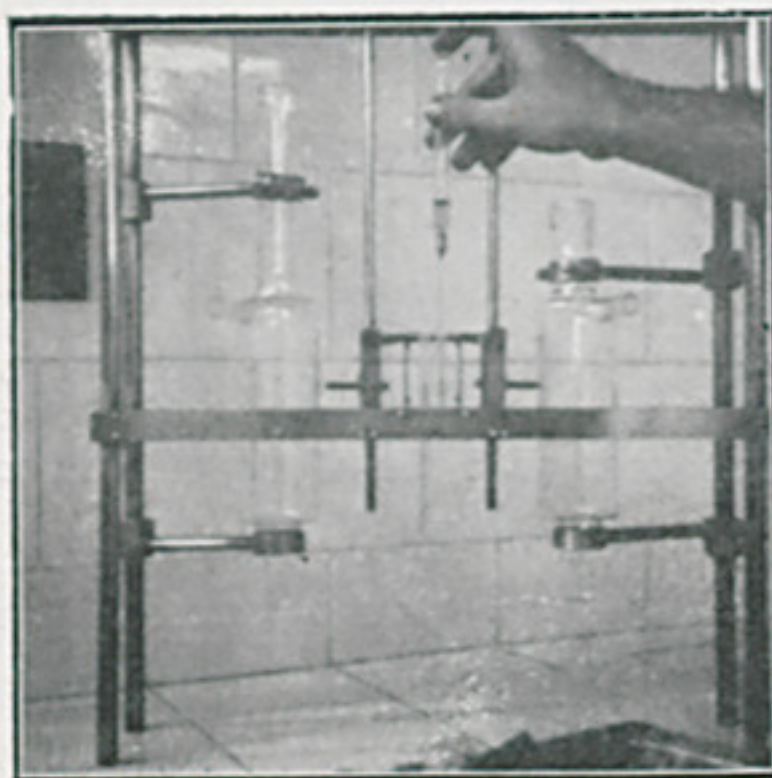


FIGURA 20
Enchendo c/proteína

c) Deslizar o centro sobre o fundo para a esquerda até fechar os canais da parte do fundo.

d) Retirar por meio de uma seringa com agulha comprida a solução proteica do canal esquerdo da parte central e lavar este canal 3 — 4 vezes com solução tampão até eliminar toda proteína, verificando o desaparecimento da espuma.

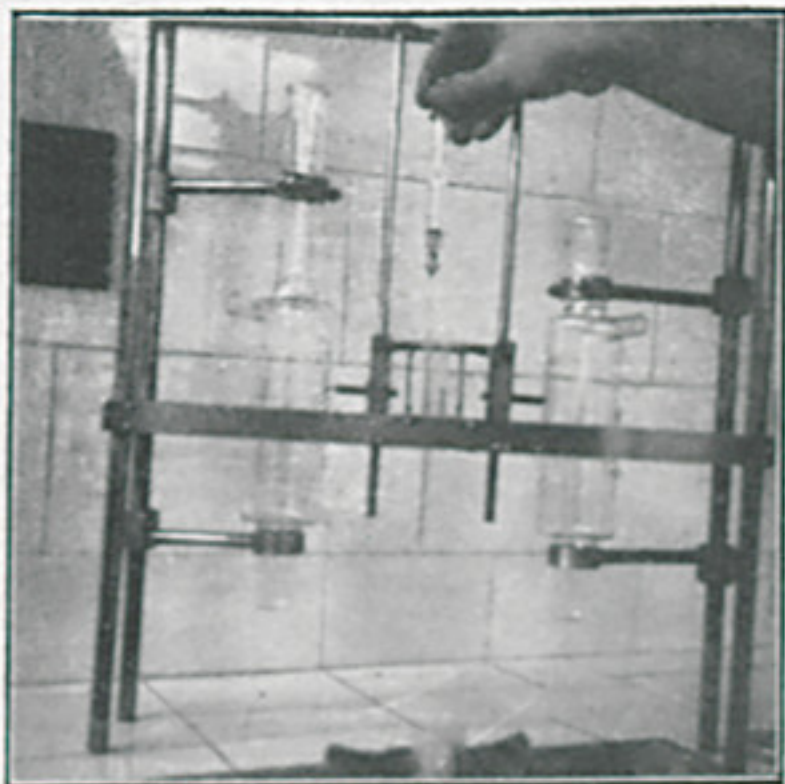


FIGURA 21
Retirando proteína

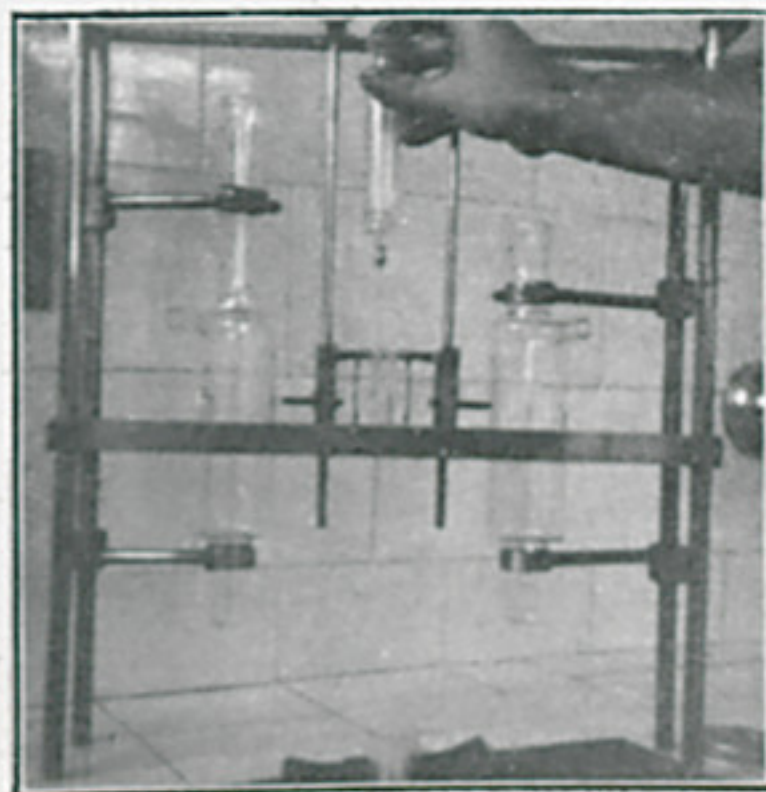


FIGURA 22
Lavando com tampão

e) Colocar a parte superior do tubo de "U" em cima da parte central desviada, de tal maneira que os canais coincidam. Encher o canal esquerdo com solução tampão e o canal direito com a solução proteica até alguns milímetros acima das faces esmerilhadas, tendo o cuidado de eliminar todas as bolhas de ar.

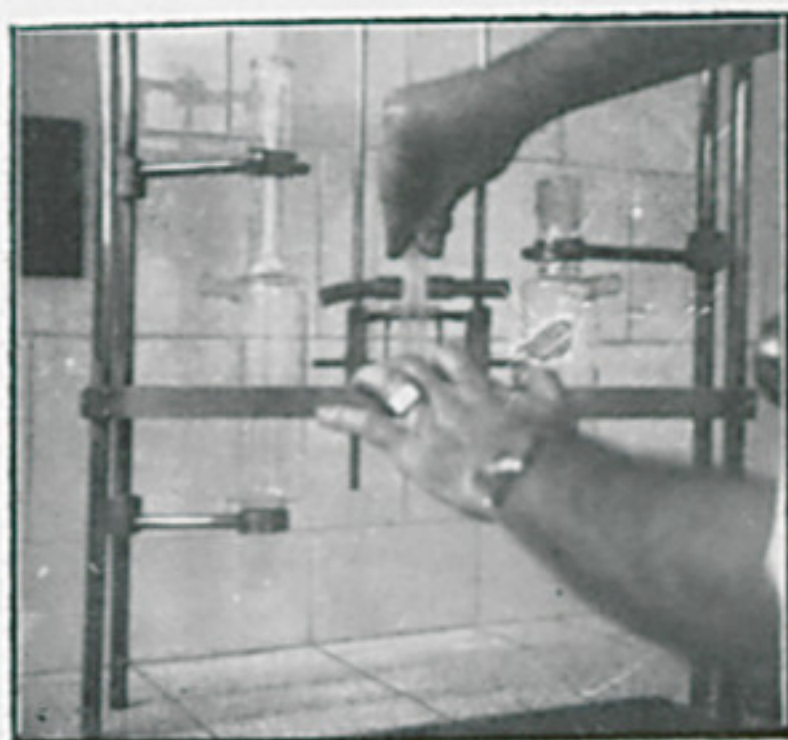


FIGURA 23
Colocando parte superior

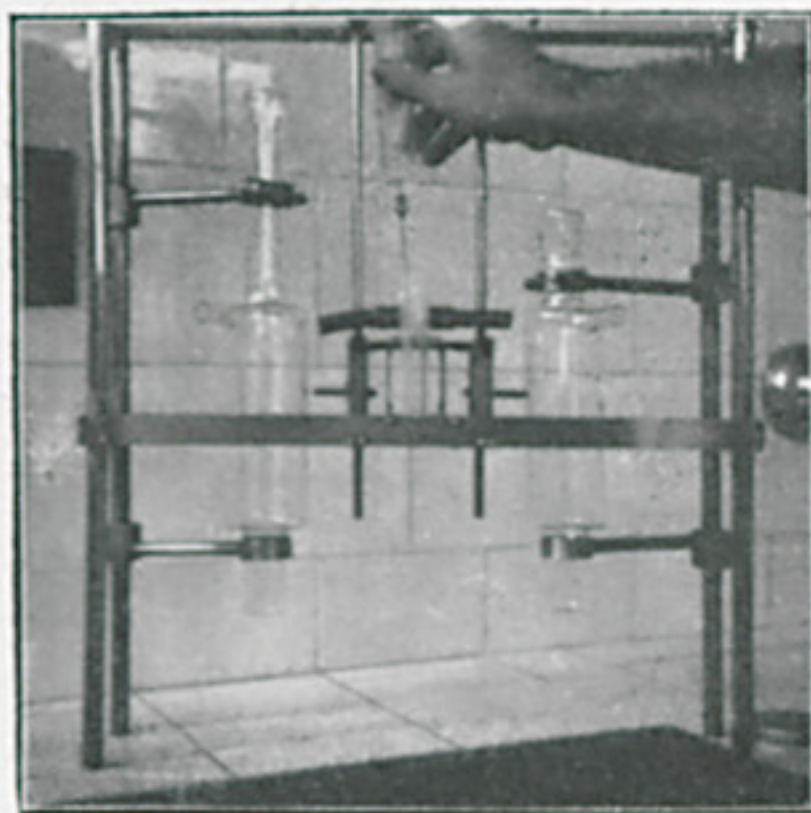


FIGURA 24
Enchendo com tampão

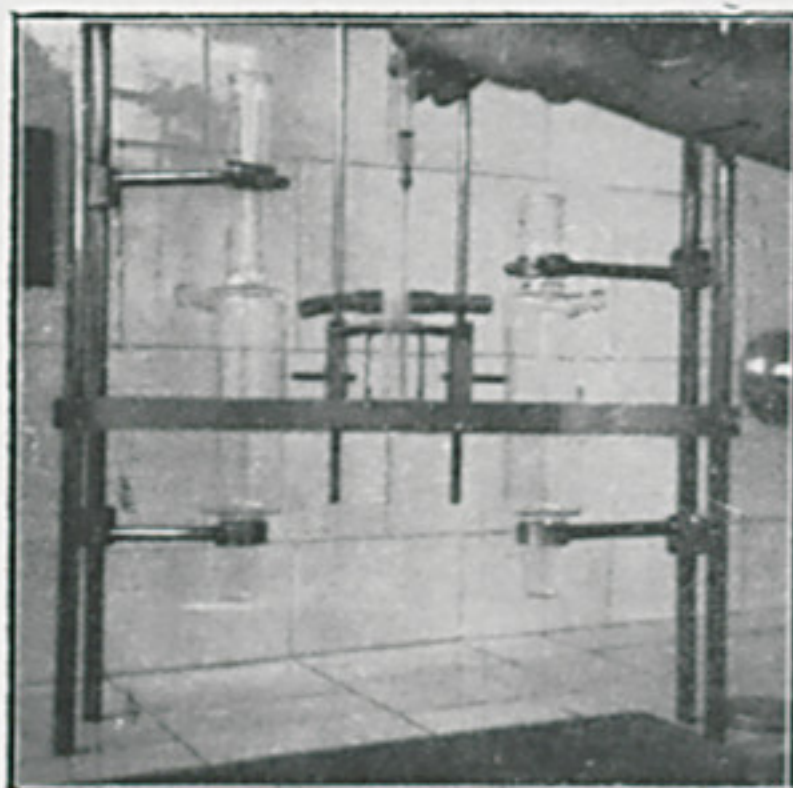


FIGURA 25
Enchendo c/ proteína

f) Firmar o fundo do tubo de "U" por meio de parafusos e a parte central por meio das fivelas e dos pistões móveis. Deslizar a parte superior do tubo de "U" para a direita até isolar a parte central. A parte superior deve ficar bem no centro do suporte com os seus canais verticalmente em cima dos canais do fundo.

g) Lavar o canal direito da parte superior com solução tampão até eliminar todos os traços de proteína. A solução proteica enche agora todo o fundo e o canal direito da parte central do tubo de "U".

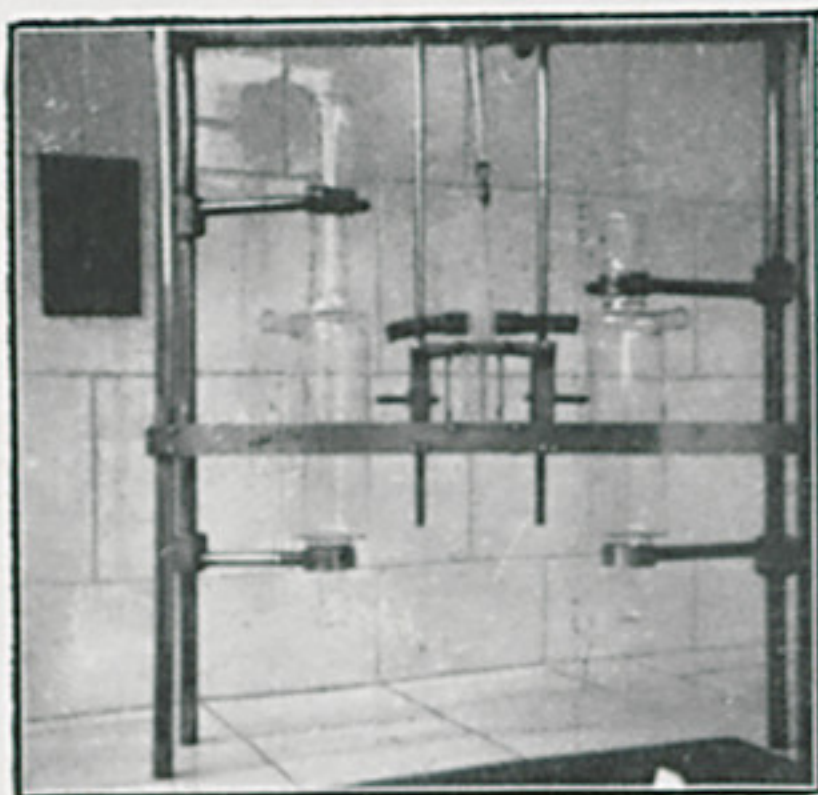


FIGURA 26
Retirando proteína

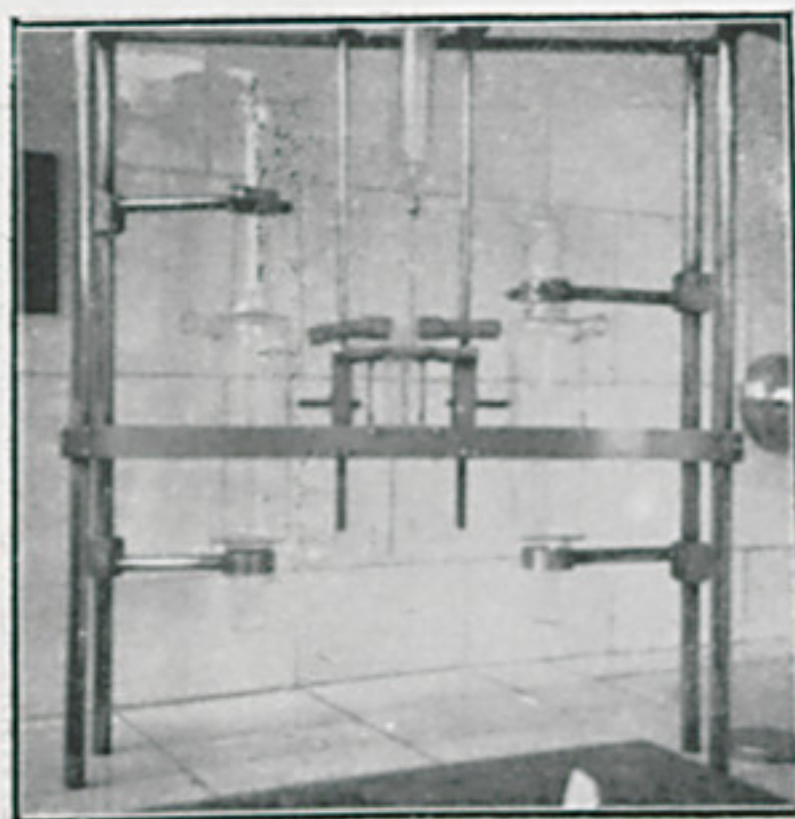


FIGURA 27
Lavando com tampão

h) Firmar a parte superior bem no centro com os parafusos e as molas e colocar os vasos electródicos, ligando seus tubos laterais á cabeça do tubo de "U" por meio de tubos de borracha flexível.

i) Encher o aparelho com solução tampão até que esta transborde pela parte superior do tubo de "U". Lembramos que tanto a solução proteica como a solução tampão devem estar numa temperatura de 2 — 5°C no momento do seu uso.

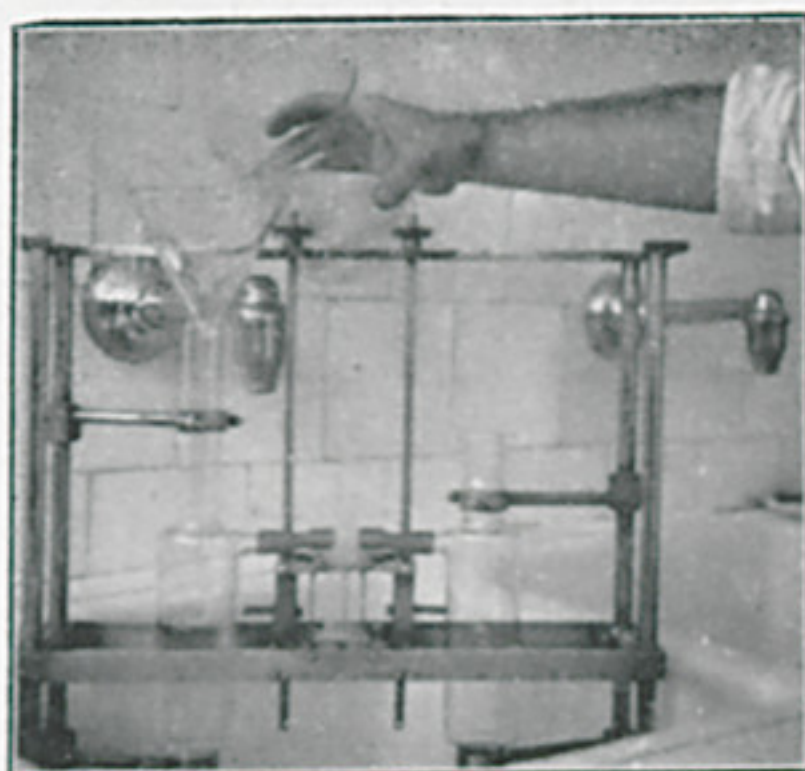


FIGURA 28
Enchendo com tampão

j) Inserir os electródios que consistem de folha de prata corrugada e soldada a um tubo de prata. Antes da experiência, os electródios são ativados por electrólise anódica durante alguns minutos, em solução de cloreto de potássio normal, usando um cátodo de carvão. Depois de cada experiência invertem-se

as posições dos electródios; quando a côr escura desaparece, os electródios devem ser ativados novamente.

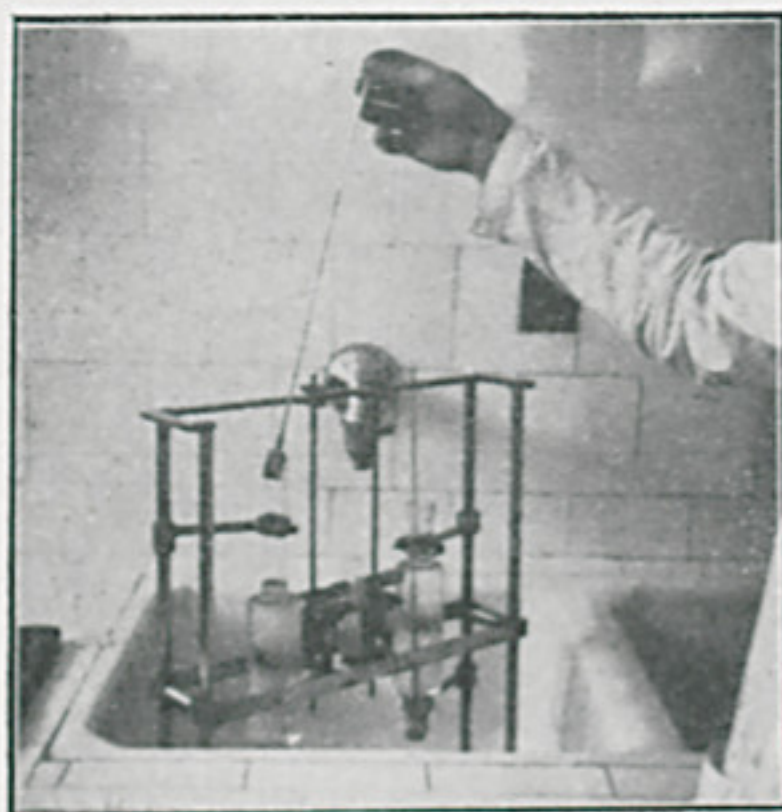


FIGURA 29
Pondo os electródios

k) Injetar lentamente com cuidado pelos tubos ocos de prata de cada electródio 8 ml de solução normal de cloreto de potássio que ficou conservada na geladeira entre 2 — 5°C.

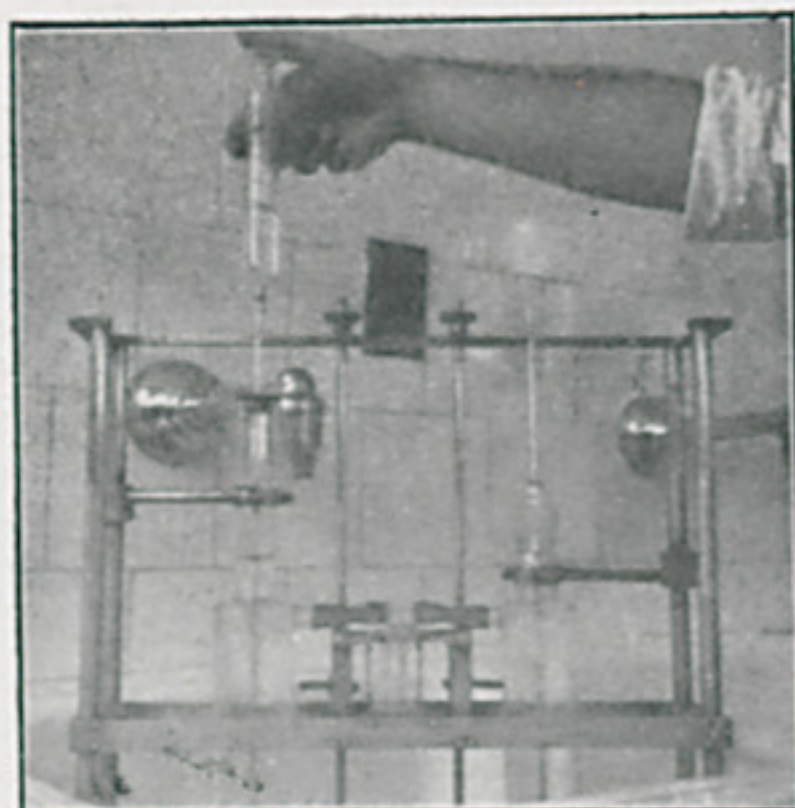


FIGURA 30
Injetando solução de KCl

1) Com um mínimo de agitação colocar o aparelho no banho, previamente esfriado até a temperatura da electroforese. Reajustar o nível da solução tampão nos dois lados do tubo de "U".

m) Ligar os electródios na fonte de corrente contínua, com o cátodo ou pólo negativo do lado direito (lado da proteína). Esperar 10 — 15 minutos para que o aparelho atinja a temperatura do banho. Acender a lâmpada de mercúrio e focalizar a parte central da célula, sem fendas e sem a lente cilíndrica.

n) Deslizar por meio dos pistões, com movimento lento e regular, a parte central do tubo de "U" para o centro até estabelecer contacto com os canais do fundo e da parte superior. É extremamente importante que esta manobra seja executada com um máximo de cuidado para evitar a mistura entre as soluções e o consequente desaparecimento das divisas.

o) Levantar um pouco a lâmina horizontal móvel. Retirar com cuidado pelo canal esquerdo da cabeça uma pequena quantidade de tampão por meio da seringa automática sincronizada, regulando o seu movimento pelo interruptor no quadro de contróle geral até que as divisas que estavam escondidas atrás das faces esmerilhadas aparecem no vidro fosco. Como as imagens estão invertidas, a divisa ascendente (lado anódico) vai aparecer em cima, e a divisa descendente (lado catódico) em baixo.

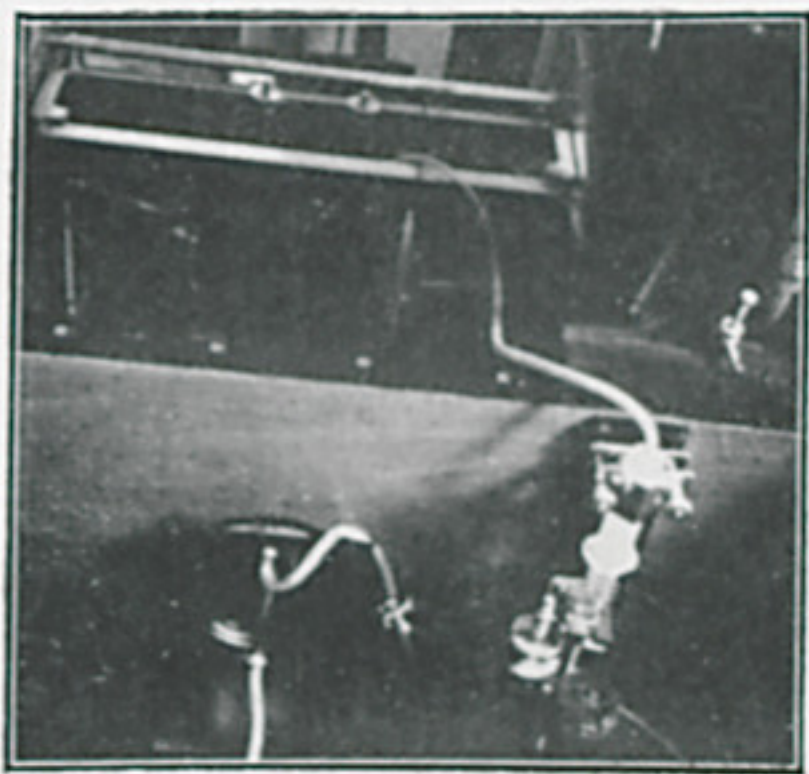


FIGURA 31
Retirando o tampão

p) Escolher o lado que se deseja observar e cobrir a imagem do outro lado por meio de uma máscara apropriada, colocada entre a fonte de luz e a lente "Schlieren". Abaixar novamente a lâmina móvel, colocar a fenda inclinada e a lente cilíndrica, e verificar que as janelas do banho não estejam emba-

çadas. Ajustar a posição da lâmpada, sem modificar a sua distância, até que a imagem no vidro fosco se mostre uniformemente iluminada.

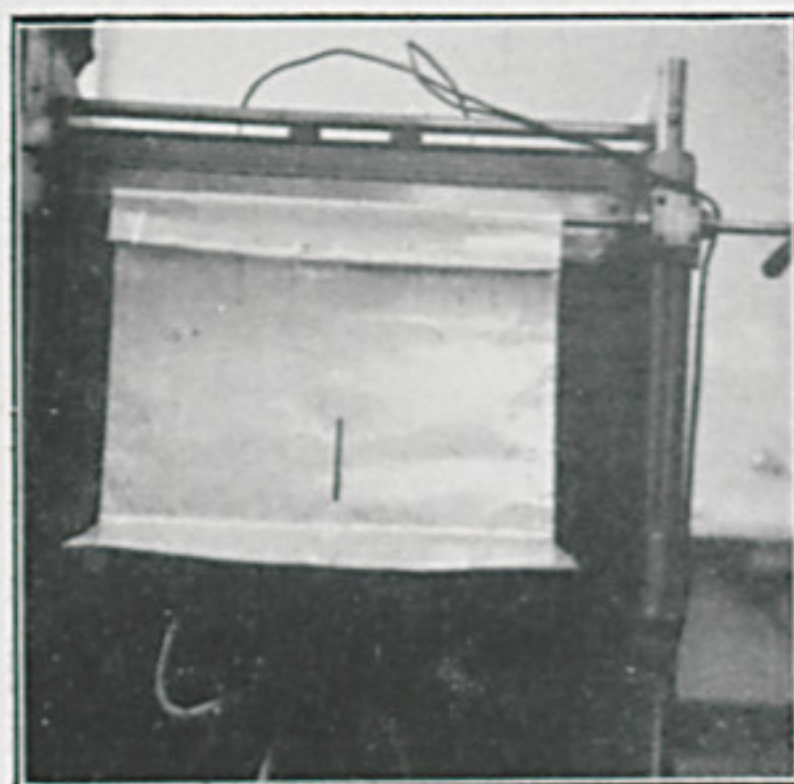


FIGURA 32
Máscara da lente

q) Observar e fotografar a curva inicial da divisa entre tampão e solução proteica.

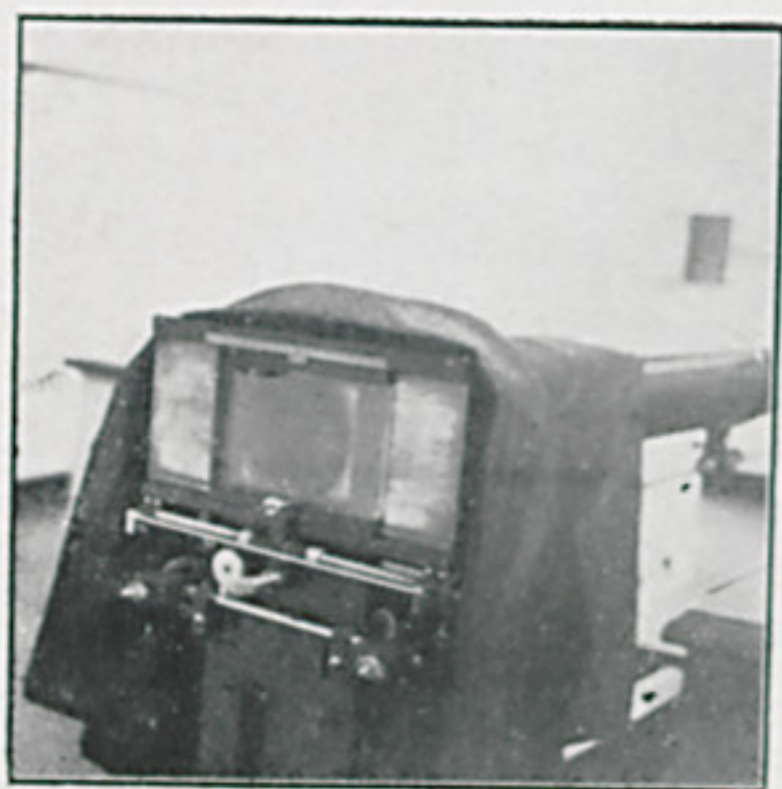


FIGURA 33
Observando p/vidro fosco



FIGURA 34
Colocando o chassis

r) Ligar a corrente nos electródios e pôr o relógio em funcionamento.
s) Tirar fotografias do perfil electroforético que se desenvolve e registrar todos os dados importantes num protocolo. (Veja modelo.)

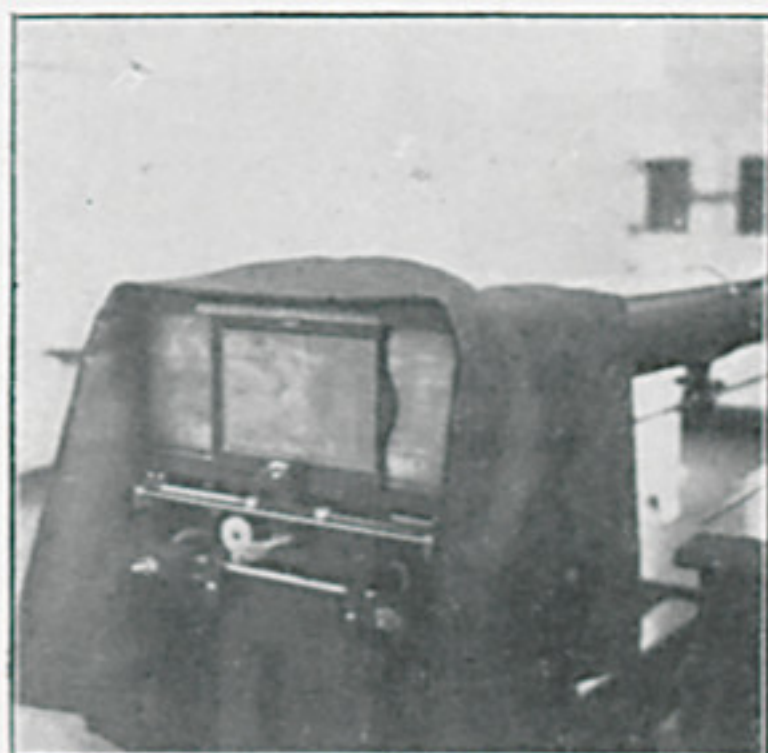


FIGURA 35
Chassis no lugar

d) *Formação do perfil*

A figura 36 mostra o progresso de uma electroforese de plasma humano, fotografada de 10 em 10 minutos, com a separação dos componentes da mistura proteica que caminham com velocidades diferentes. Entretanto, as curvas não indicam diretamente os componentes, mas apenas a refração da luz nas divisas. Mas como esta refração é proporcional á concentração dos componentes, o perfil indica as suas posições na célula e, pela área em baixo de cada pico da curva, a quantidade de cada fracção.

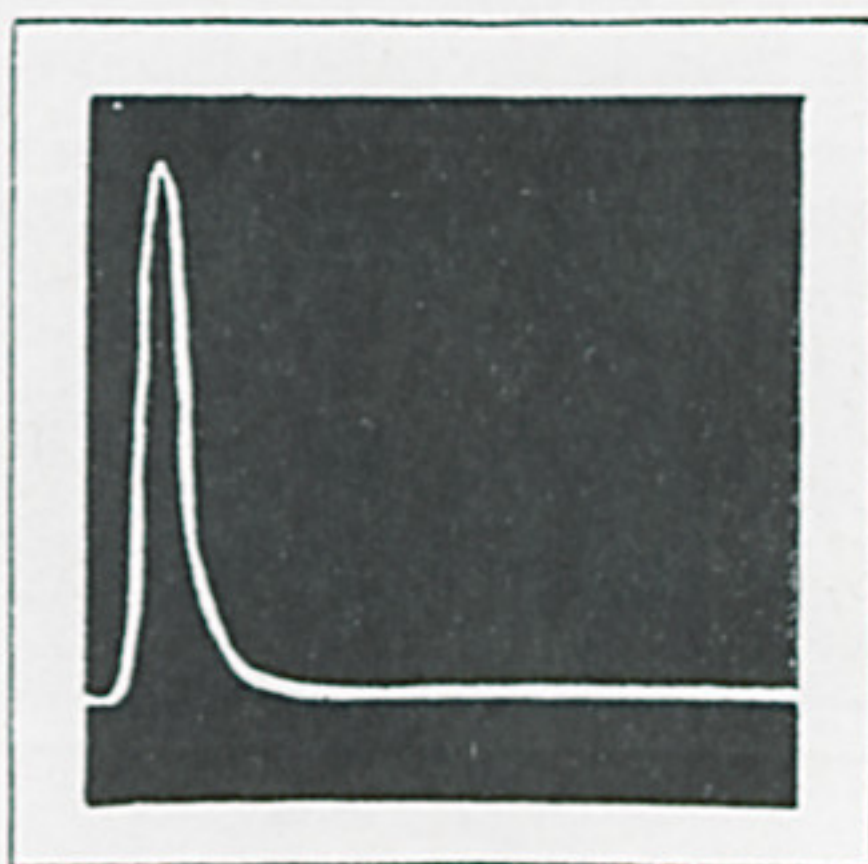
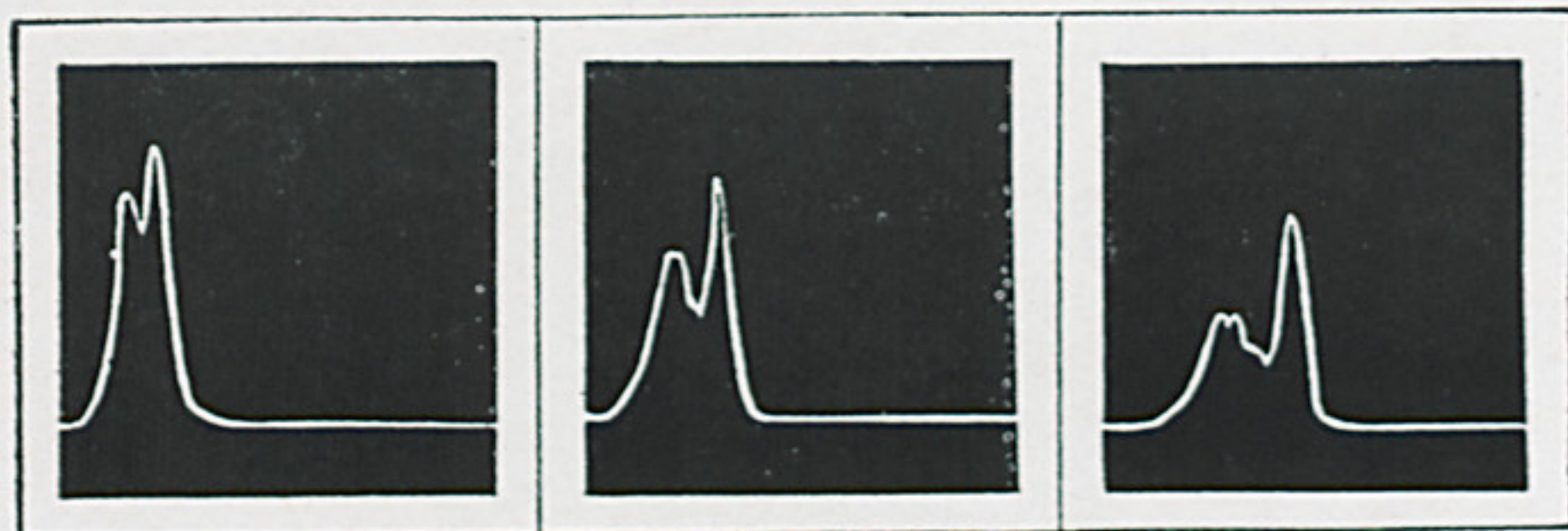


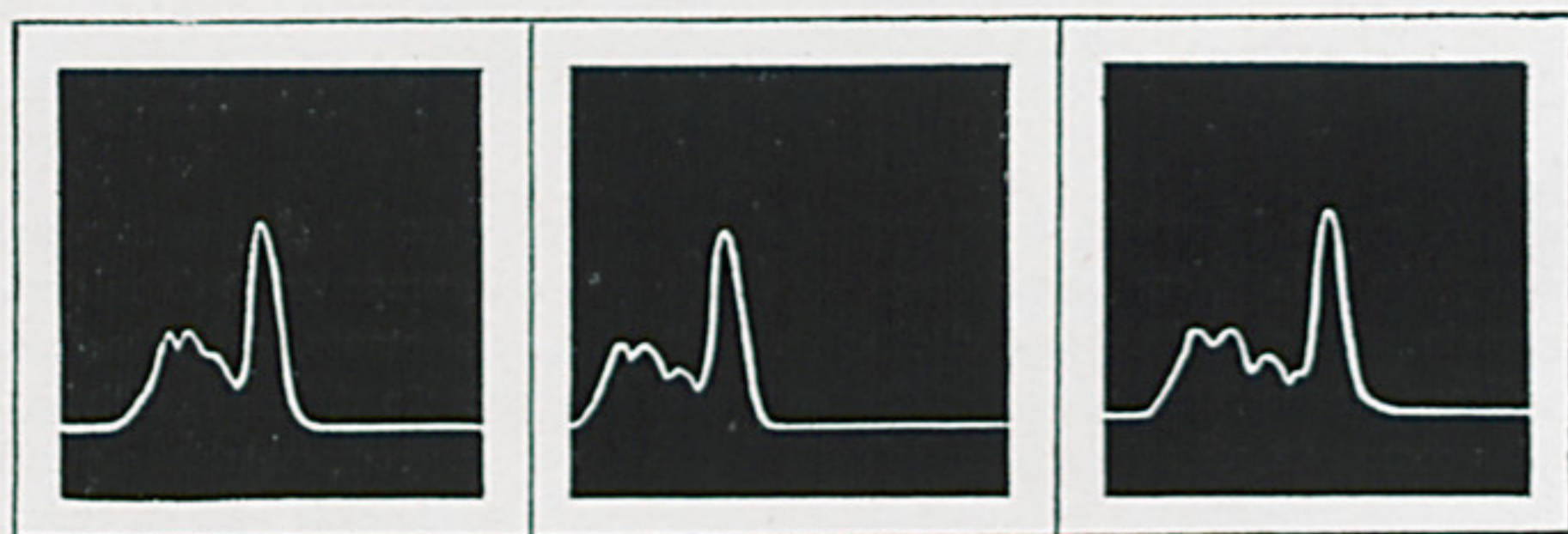
FIGURA 36
Divisa inicial



Após 10 minutos

Após 20 minutos

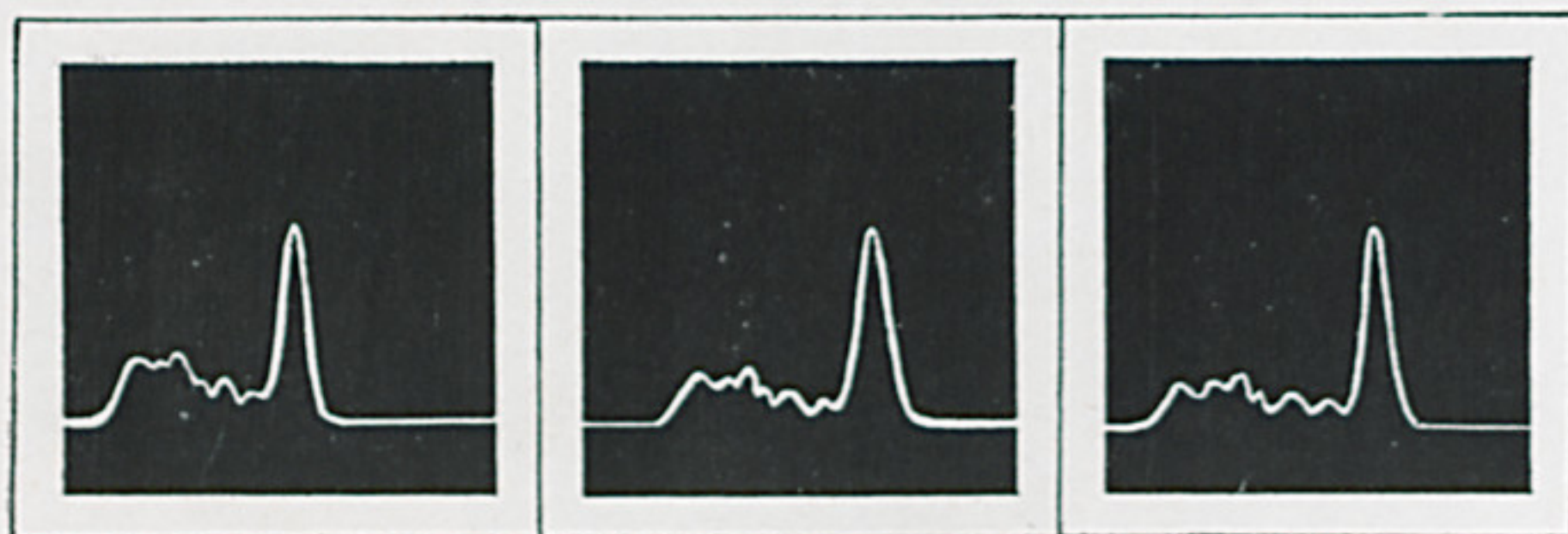
Após 30 minutos



Após 40 minutos

Após 50 minutos

Após 60 minutos



Após 70 minutos

Após 80 minutos

Após 90 minutos

PROTÓCOLO DE ELECTROFORESE

Número..... Material.....
Nome..... Caso clínico.....

Diálise

Data do início..... Data do fim.....
Condições..... Temperatura.....
pH..... Tampão..... Força iônica.....
Volume posto..... Volume retirado.....
Volume final após diluição com tampão.....
Índice de refração do tampão..... da solução.....
Condutibilidade do tampão..... da solução.....

Electroforese

Data..... Início.....horas Fim.....horas
Distância da divisa inicial: Lado A..... Lado D.....
Temperatura do banho..... Voltagem..... Amperagem.....

Fotografia

1)	Minutos.....	Sistema.....	Ângulo.....	Chassis.....	Dist.....	Lado A D
2)	"	"	"	"	"	" A D
3)	"	"	"	"	"	" A D

Medições adicionais

Célula usada..... Área transversal.....
Voltagem na célula..... Fator de aumento.....
Observações

Cálculos

Distância	Mobilidade	Fracção	Área	Concentração relativa
-----------	------------	---------	------	-----------------------

Responsável.....

V) ANÁLISE DAS OBSERVAÇÕES ELECTROFORÉTICAS

a) *Análise dos traçados*

A análise dos traçados ou perfis electroforéticos fornece dados que permitem calcular a quantidade relativa de cada componente da mistura proteica e a sua mobilidade no campo eléctrico. Quando as condições da electroforese são escolhidas com cuidado, a imagem do lado ascendente deve dar os mesmos valores que aquela do lado descendente. Neste caso, recomenda-se analisar apenas o perfil da lado descendente. Onde não foi possível eliminar diferenças maiores entre as duas imagens, recomendamos usar o lado ascendente para calcular as áreas, e o lado descendente para a determinação das mobilidades. As discrepâncias entre os dois lados servem para controlar as condições da experiência. As electroforeses que dão menor erro e que são mais reproduzíveis são aquelas onde as divergências entre o lado ascendente e o lado descendente foram eliminadas pelo acerto das concentrações relativas das soluções.

Para o mesmo perfil, as constantes (m) , (a) , (b) , e (θ) são iguais, e (K) é praticamente a mesma para todas as frações do plasma; no caso de misturas desconhecidas, entretanto, é preciso determinar o incremento específico da refração por análises químicas e refratométricas de cada fração. Para este fim retira-se uma parte da fração por meio da seringa sincronizada, submetendo o êmbolo da seringa a um movimento lento e uniforme pelo motor.

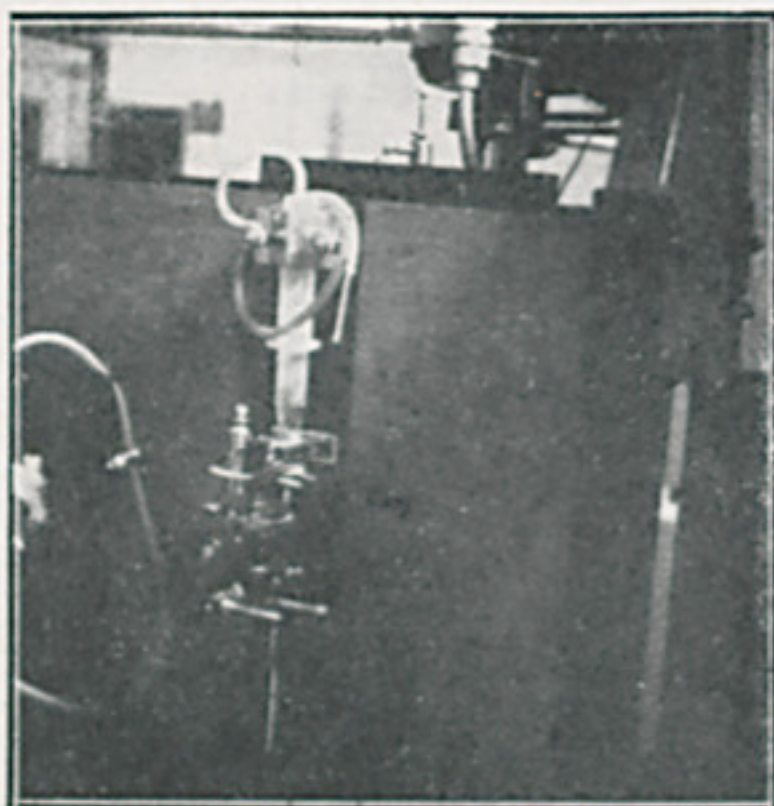


FIGURA 37
Seringa sincronizada

O líquido da seringa é então analisado por processos químicos para deduzir a concentração da substância (c) . Determina-se em seguida a diferença da

refração antes e depois de uma diluição com volume igual de solução tampão. Si esta diferença fôr Δn , teremos

$$K = \frac{2}{c} \Delta n$$

(Fórmula 20.)

No caso de plasma e de outros líquidos de refração conhecida é suficiente proceder á análise geométrica do traçado para determinar as concentrações relativas dos componentes.

b) *Análise geométrica*

Esta é a parte mais trabalhosa e mais arbitrária da electroforese. Embora cada divisa forme um pico bem definido no perfil electroforético, a avaliação da área em baixo deste pico encontra dificuldades quando se trata de subdividir a área total do perfil, que corresponde a várias divisas parcialmente superpostas, e designar aquela parte que pertence a cada divisa individual. Devemos lembrar que os contornos desta área individual têm uma forma correspondente á curva de Gauss que tem dois parâmetros variáveis: a altura máxima e a largura da base. Teoricamente não há razão para que a curva seja simétrica em torno da altura máxima, mas na prática encontramos quase sempre curvas simétricas. Passamos a indicar os vários métodos que têm sido usados para analisar os perfis.

c) *Método de Tiselius e Kabat*

Estes autores subdividem a área total por ordenadas que passam pelos pontos de inflexão da curva entre os picos. A área assim separada em baixo de cada pico é determinada por planimetria.

Medindo a área total pode-se calcular a porcentagem da cada fracção sobre o total, presumindo que o índice de refração é igual para todas as fracções.

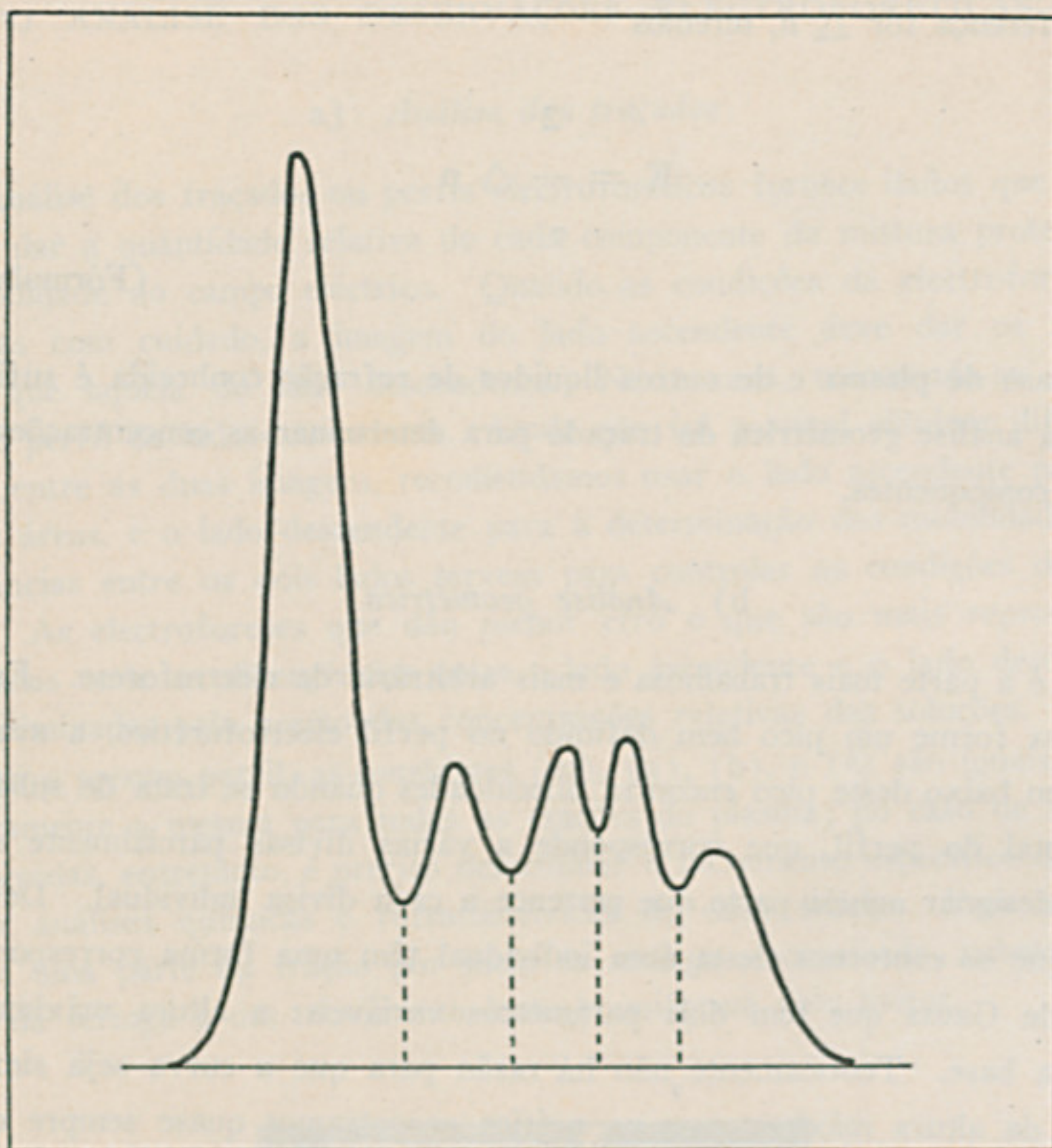


FIGURA 38
Método de Tiselius e Kabat

d) *Método de Pedersen*

A área total é a soma das áreas individuais formadas pelas divisas. Cada divisa individual contribui com o seu perfil electroforético, formado por uma área cujos contornos correspondem á uma curva de Gauss. Pedersen subdivide assim a área total por várias curvas de Gauss simétricas onde as ordenadas máximas coincidem com os picos. A área em baixo de cada curva é determinada por planimetria como antes.

e) *Método de Labhart*

A dificuldade do método de Pedersen reside na incerteza de desenhar uma curva de Gauss quando não se conhecem os parâmetros. Labhart inventou um

instrumento que utiliza a superposição óptica de curvas normais de Gauss. Um diapositivo com curvas normais de várias alturas projeta a imagem destas curvas em cima de uma cópia ampliada do perfil electroforético. Por inclinação do diapositivo ao redor de um eixo que coincide com o bisector vertical das curvas pode-se variar a área e a base das curvas até encontrar aquela que melhor se adapta aos contornos do perfil. A altura da curva normal usada e o ângulo de inclinação do diapositivo permitem calcular a área, evitando assim o uso do planímetro.

f) *Método de Wiedemann*

O método de Labhart é trabalhoso e exige um aparelho complicado com lentes sem aberrações, além de se basear na simetria das curvas. Lembrando que se deve esperar pequenas assimetrias nas curvas de difusão de substâncias que não obedecem os critérios de pureza indicados por Lamm, Wiedemann usa um método engenhoso para avaliar as áreas num aparelho projetor que permite variar a ampliação da imagem sem diminuir a nitidez. Um diapositivo contém 16 curvas normais de Gauss, agrupadas em 4 grupos de alturas diferentes e bissectadas verticalmente para permitir a projeção de metades de curvas normais sobre uma cópia ampliada do perfil electroforético. Pela variação do grau de aumento, tanto horizontal como vertical, da imagem fornecida pelo diapositivo pode-se adaptar a curva aos contornos do perfil. A área total que é a soma das duas metades em baixo de cada pico é dada pela fórmula.

$$F = \left(\frac{F}{2e} + \frac{F}{2d} \right) s^2$$

(Fórmula 21.)

onde $\frac{F}{2e}$ indica a área

da metade esquerda e $\frac{F}{2d}$ aquela da metade direita da curva, sendo (s) uma

distância marcada no diapositivo e cuja medida permite calcular o aumento da imagem. Os valores de (F) são tirados de uma tabela ou de um gráfico. Este método é o mais preciso entre todos e permite descobrir divisas pequenas que não aparecem no perfil á primeira vista quando o pico de sua fracção não se eleva acima dos contornos da curva. (Veja por exemplo a curva da fracção *a*, na Figura 39.). A análise do perfil nas partes onde há super-

posição de duas ou mais curvas é um processo demorado que exige a extrapolação das curvas e a correção repetida de suas ordenadas cuja soma tem que dar a ordenada do perfil total em todos os pontos.

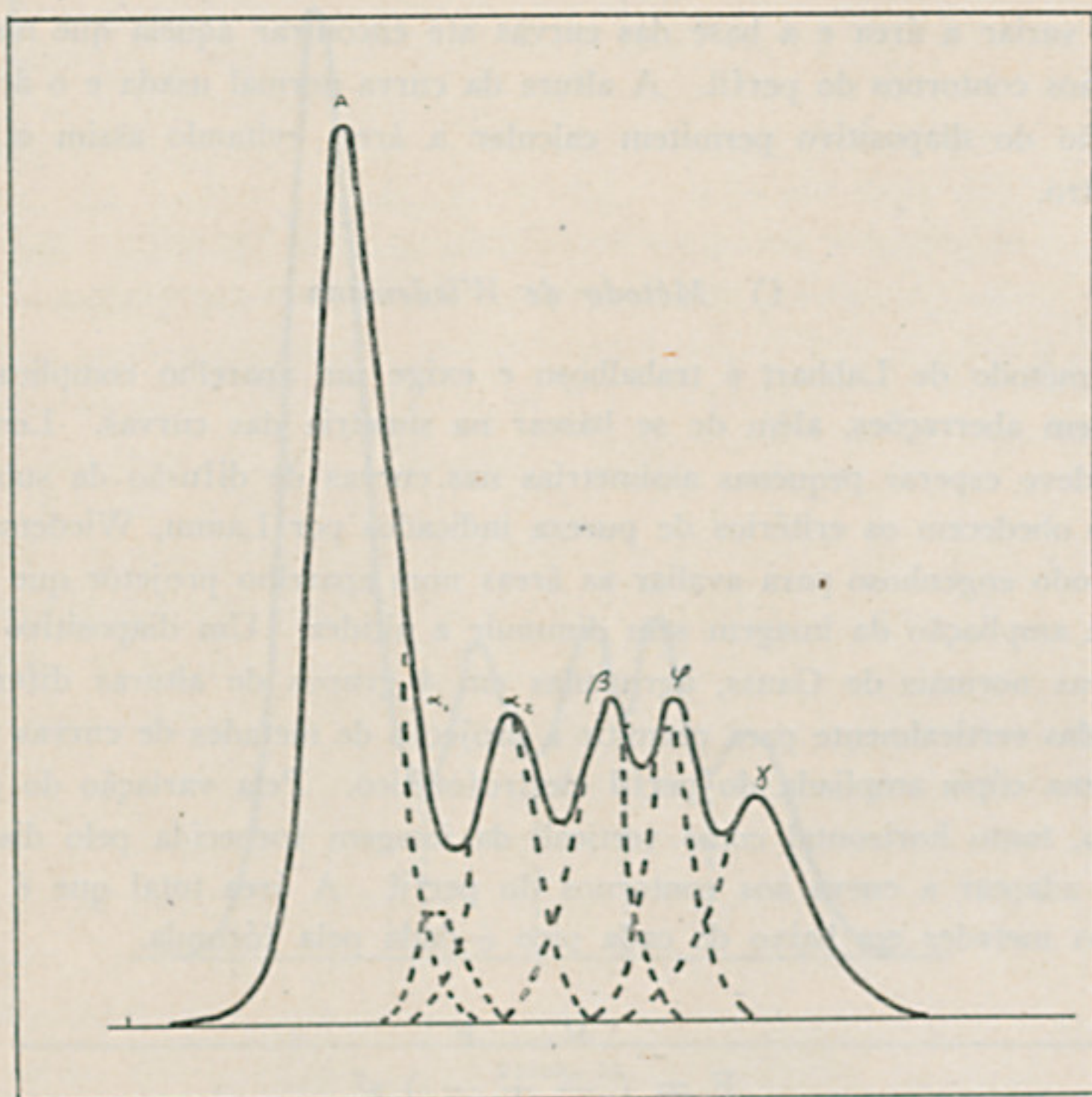


FIGURA 39
Método de Wiedemann

g) *Nosso método*

Para evitar a possibilidade de erros ópticos na análise pelo método de Wiedemann que exige um aparelho projetor com lentes perfeitas, um diapositivo com curvas normais e uma tabela das áreas destas curvas, imaginamos um método puramente geométrico para analisar uma cópia ampliada do perfil electroforético. O nosso processo se baseia na medida de dois parâmetros da curva de Gauss. Examinando a formação das curvas no perfil lembramos que elas representam as mudanças do índice de refração nas divisas. Uma divisa é uma discontinuidade onde duas fases de diferentes composições se tocam. Tomando como exemplo a divisa entre a fracção da albumina e a solução tampão onde a tensão inter-superficial é pequena demais para evitar a difusão das duas

soluções em ambas as direções, podemos ver que as partículas de uma solução não vão formar uma frente única, mas vão se distribuir dentro da outra solução, conforme os caminhos traçados por cada partícula individual. Quanto mais longe da divisa que representa o grosso das partículas, menos partículas da mesma fase vão ser encontradas e menor será a discontinuidade, menor a variação da composição e a diferença entre os índices de refração. Esta distribuição em torno da divisa obedece à probabilidade estatística de encontrar uma partícula da primeira fase num determinado ponto dentro da segunda fase. Traçando um gráfico desta probabilidade, vamos obter uma figura como a seguinte:

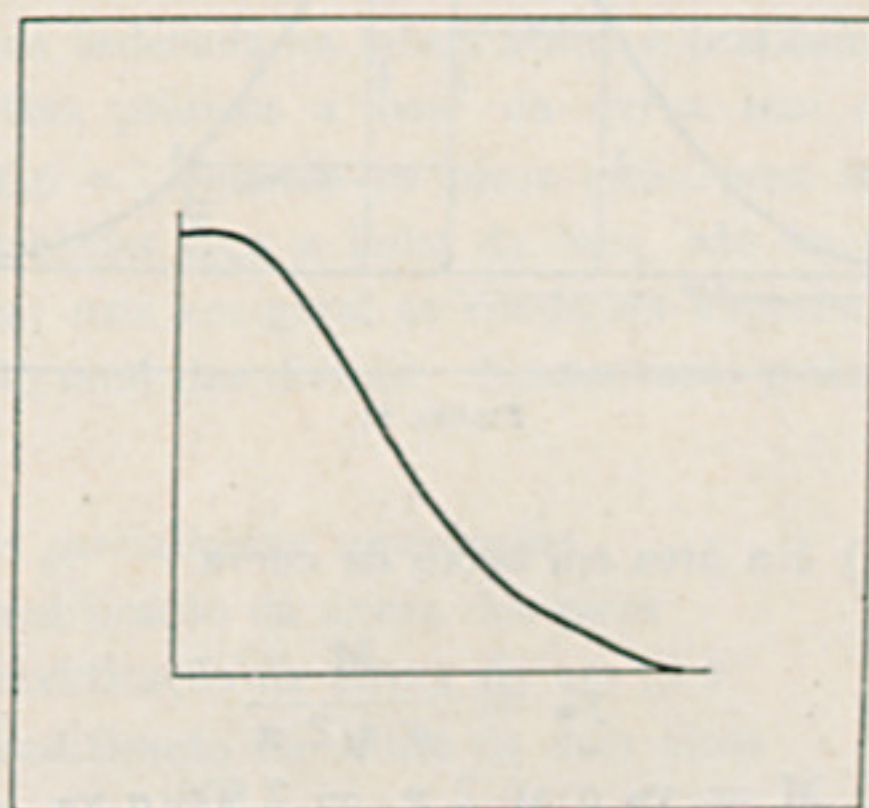


FIGURA 40

onde a abcissa representa a distância a partir da divisa, e a ordenada o número de partículas (de albumina), em fracção porcentual da concentração na divisa, encontradas naquela distância. O mesmo se aplica às partículas da fase 2 que avançaram para dentro da fase 1. Si a probabilidade de encontrar uma partícula num determinado ponto fôr (p) e a probabilidade de encontrar nenhuma partícula da mesma fase fôr (q), a fórmula para o desvio padrão σ da distribuição é

$$\sigma = \sqrt{M \cdot p \cdot q}$$

onde (M) é o número total de partículas de uma fase dentro da outra. (M) é proporcional à diferença de composição entre as duas fases e indica assim a quantidade da albumina na fase 1, pois a presença da albumina é o único fator que diferencia a fase 2 da fase 1. (M) é também proporcional à área em baixo da curva total. A fórmula para a curva de distribuição segundo Gauss é

$$y = \frac{M}{\sigma \sqrt{2\pi}} e^{-\frac{X^2}{2\sigma^2}}$$

onde o coeficiente $\left(\frac{M}{\sigma \sqrt{2\pi}} \right)$ é

igual a ordenada máxima que é a altura (y_m) da curva.

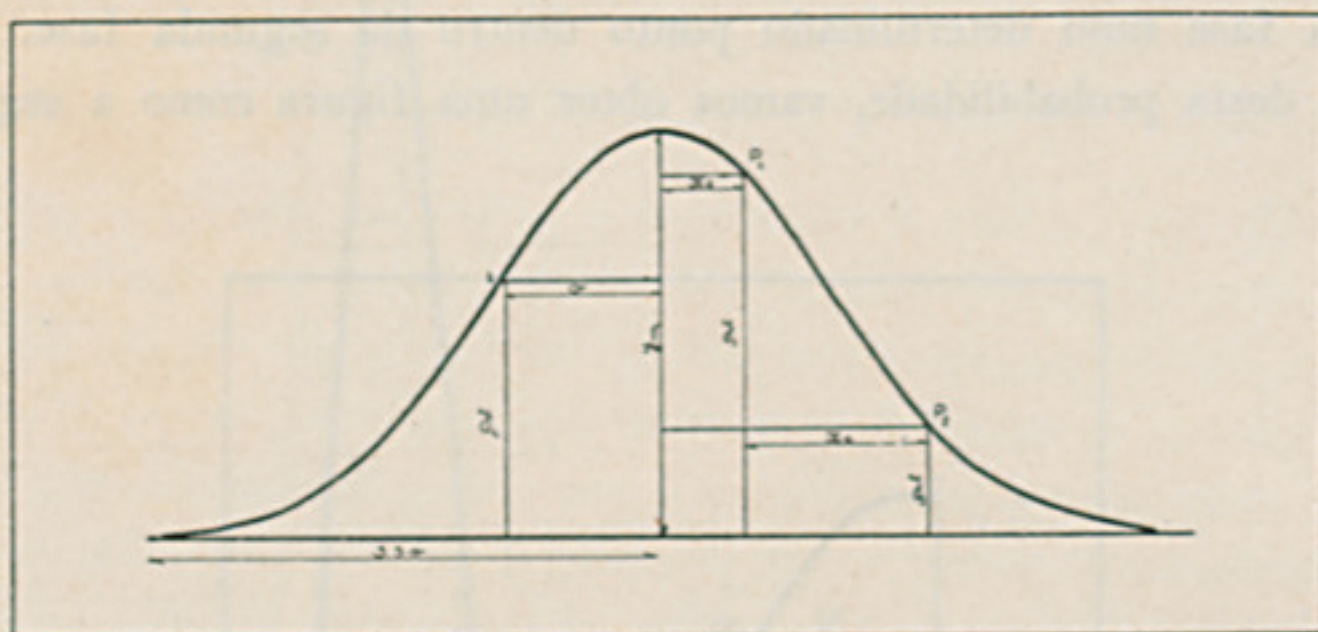


FIGURA 41

Neste caso, (M) é a área em baixo da curva.

$$y_m = \frac{M}{\sigma \sqrt{2\pi}}$$

dando $M = y_m \sigma \sqrt{2\pi} = 2,506 \sigma y_m$

(Fórmula 22.)

Conhecendo então os dois parâmetros σ e y_m , podemos calcular a área pela fórmula indicada. A altura máxima (y_m) de cada pico pode-se medir com precisão, mas para achar o parâmetro σ temos que fazer uma aproximação baseada nos seguintes fatos: Consultando uma tabela das abcissas e ordenadas da curva normal, verificamos que a abcissa é igual a σ para um ponto cuja

ordenada é $\frac{0,2420}{0,3989}$ da ordenada máxima. Esta fracção corresponde aproxi-

madamente a 60 % da altura (y_m) da curva (valor exato: 60,66 %). Basta assim medir a abcissa de um ponto da curva situada 2/5 abaixo do pico. Este ponto corresponde também ao ponto de inflecção da curva normal, onde a tangente atinge um ângulo máximo com a base. Podemos calcular a ordenada (y_1) do ponto de inflecção pela fórmula

(Fórmula 23.).

$$y_1 = \frac{y_m}{\sqrt{e}} = 0,606 y_m$$

Uma vez determinado o valor de σ e calculada a área pela fórmula 22. podemos traçar a curva inteira por meio da seguinte relação entre as abcissas e ordenadas de alguns pontos da curva normal.

ABCISSA	ORDENADA
0	y_m
0,5 σ	0,885 y_m
1,0 σ	0,606 y_m
1,5 σ	0,325 y_m
2,0 σ	0,135 y_m
3,3 σ	0,004 y_m

O último valor da ordenada na tabela acima é praticamente zero e podemos concluir que para fins práticos a base da curva tem um comprimento de $3,3 \sigma + 3,3 \sigma = 6,6 \sigma$. Quando os picos estão bem separados de tal maneira que a área entre eles toca a linha da base, não ha nenhuma dificuldade na análise geométrica; mas em geral as condições experimentais não permitem chegar até a separação total das divisas. Nestes casos podem surgir várias complicações:

- a) Duas divisas parcialmente superpostas
 - 1 — sem modificação da altura dos picos
 - 2 — com modificação da altura de um pico
 - 3 — com modificação da altura de dois picos
- b) Tres divisas parcialmente superpostas.

Verificamos que ha sempre nos lados extremos de cada perfil uma parte da curva que provém de uma única divisa. Aproveitamos assim dois pontos naquela parte da curva para calcular o resto e determinar o valor do parâmetro σ pela fórmula

$$\sigma^2 = \frac{x_2^2 - x_1^2}{2 \ln y_1/y_2}$$

onde x_1 é a abcissa do ponto P_1 e x_2 do ponto P_2 .

y_1 e y_2 são as ordenadas correspondentes. Transformando em logaritmos comuns, vamos obter

$$\sigma^2 = 0,217 \frac{x_2^2 - x_1^2}{\log y_1/y_2}$$

(Fórmula 24.)

A análise geométrica do perfil compreende, em resumo, os seguintes passos:

- 1.º) Aumentar o perfil fotográfico por projeção ou com pantógrafo para obter uma cópia ampliada.
- 2.º) Marcar a linha da base e os contornos do perfil, usando a margem inferior no caso de linhas grossas.
- 3.º) Indicar o ponto de origem, i.e. a posição inicial da divisa antes da passagem da corrente.
- 4.º) Traçar linhas perpendiculares á linha da base através dos picos do perfil, indicando assim a posição das divisas que são discerníveis á primeira inspecção.
- 5.º) Escolher dois pontos na parte mais avançada do perfil, determinar suas ordenadas e abcissas a partir da última ordenada máxima e calcular σ pela fórmula 24.
- 6.º) Marcar a base da curva, ($= 6,6 \sigma$) e observar si ela corresponde ao ponto mais avançado do perfil. Si isso não fôr o caso, um dos pontos escolhidos não faz parte da mesma curva e o contorno total não corresponde a uma única divisa mas a duas ou mais que estão parcialmente superpostas. Neste caso pode-se usar a medida da metade da base real, do ponto mais avançado até o pé da primeira ordenada máxima, para calcular σ e traçar então os contornos da primeira divisa pela tabela acima, deduzindo o valor de (y_m) do ponto de inflecção.
- 7.º) Traçar provisoriamente a outra metade da curva, tomando-a como simétrica em redor da ordenada máxima. A verificação posterior da soma das alturas em vários pontos permite descobrir si alguma das curvas não foi simétrica e corrigir o desvio.
- 8.º) Observar em que ponto a primeira curva se afasta do perfil e determinar a abscissa deste ponto a partir da segunda ordenada máxima. Esta distância é a base da metade mais avançada da segunda curva.
- 9.º) Continuar desta maneira até analisar todo o perfil, conferindo sempre a soma das alturas e marcar a diferença, onde houver, como nova ordenada, descobrindo assim as divisas escondidas.
- 10.º) Calcular a área em baixo de cada curva pelas fórmulas indicadas e medir as distâncias das ordenadas máximas a partir do ponto de origem, para determinar a mobilidade, lembrando-se de dividir pelo fator de aumento linear da máquina fotográfica e da ampliação da cópia.

h) *Cálculo da mobilidade aparente*

A mobilidade electroforética é definida como a velocidade num campo de força $H = 1$. Si (w) é o caminho percorrido no tempo (t) , então

$$v = \frac{w}{t} \quad \text{e a mobilidade } u_A = \frac{v}{H} = \frac{w}{t H}$$

O campo de força (H) é uma função da corrente:

$$H = \frac{I}{Q k_S} \quad \text{onde } \begin{array}{l} I = \text{corrente em ampéres} \\ Q = \text{área transversal da célula} \\ k_S = \text{condutibilidade específica} \end{array}$$

Assim vamos obter

$$u_A = \frac{w k_S Q}{I t} \quad (\text{Fórmula 25.})$$

onde (w) é o caminho em centímetros percorrido pela divisa em (t) segundos, num meio de condutibilidade (k_S) através de um tubo de secção transversal de (Q) cm² sob o impulso de uma corrente eléctrica de (I) ampéres. Também,

$$I = Q k_S E$$

onde (E) é a voltagem por cm na célula, dando

$$u_A = \frac{w}{E t} \quad (\text{Fórmula 26.})$$

Ha, entretanto, certa dificuldade técnica em medir a queda de potencial na célula e porisso preferimos usar a fórmula 25. embora ela exija conhecimento da condutibilidade. Esta pode ser determinada aparte, colocando uma célula de condutibilidade num banho da mesma temperatura do experimento electroforético e usando o método de Kohlrausch para medir a condutibilidade com uma ponte de Wheatstone, alimentada por corrente alternada de alta ciclagem, e que tem um alto-falante ou um olho eléctrico no lugar do galvanómetro. (Figura 42).

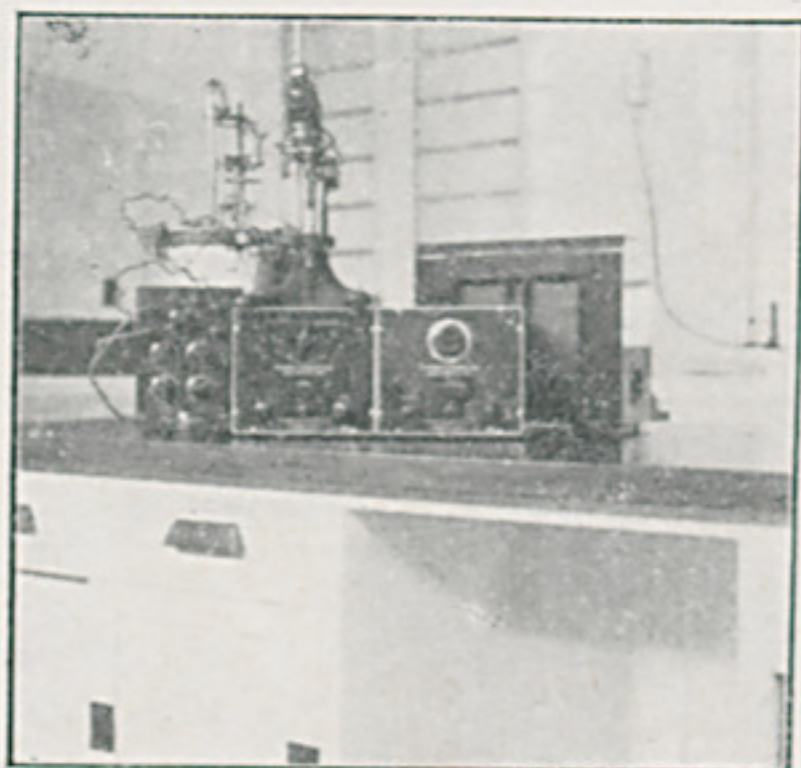


FIGURA 42

VI) RESUMO

Nesta primeira parte do seu trabalho, os autores apresentam a teoria da electroforese de partículas coloidais. Eles explicam os métodos em uso, dando detalhes da técnica e indicando os processos de análise das observações electroforéticas.

SUMMARY

In this first part of their publication the authors present the theory of electrophoresis of colloidal particles. They explain the methods in use, giving details of the technique and indicating the processes of analysis of electrophoretic observations.

ZUSAMMENFASSUNG

In diesem ersten Teil ihrer Arbeit geben die Autoren einen Überblick über die Theorie der Elektrophorese von kolloidalen Teilchen. Sie erklären die verfügbaren Methoden, zeigen Einzelheiten der Technik und der Analyse von elektrophoretischen Beobachtungen.

LISTA DOS SÍMBOLOS USADOS

A	=	amperímetro
AG	=	agitador
B	=	banho
BV	=	bomba de vácuo
C	=	constante da forma da partícula

CE	=	célula electroforética
CG	=	chave geral da entrada de 110 volts, corrente alternada
D	=	constante de difusão
E	=	tensão em volts
EM	=	eixo do motor da lâmina horizontal
F	=	área da fórmula de Wiedemann
FL	=	fendas e lâminas do sistema óptico
FO	=	motor do fecho da objetiva
G	=	geladeira do banho
H	=	força do campo elétrico
I	=	corrente em ampéres
K	=	incremento específico da refração
L	=	lâmpada
LC	=	motor da lâmina e chapa
LS	=	lente "Schlieren"
M	=	número de partículas
N	=	número de Avogadro
O	=	objetiva
OT	=	tubo óptico
P	=	ponto da curva de Gauss
Q	=	área da secção transversal da célula
R	=	relógio
RC	=	retificador da corrente
S	=	diafragma da lâmpada
SS	=	motor da seringa sincronizada
T	=	temperatura absoluta
TG	=	termoregulador do banho
TL	=	transformador da lâmpada
TR	=	trilho do sistema óptico
V	=	voltmetro
VF	=	vidro fosco
Z	=	lente cilíndrica

lado A	=	lado ascendente da célula
lado D	=	lado descendente da célula

a	=	grossura da célula electroforética
b	=	distância entre célula e fenda
c	=	concentração
d	=	grossura da camada eléctrica dupla de Helmholtz
e	=	carga do electron
f	=	plano de contacto de duas soluções
g	=	constante de proporcionalidade
h	=	altura na célula
i	=	espécie iônica
j	=	relação entre o movimento da chapa e o movimento da lâmina

k	=	constante de Boltzmann
k_s	=	condutibilidade específica
m	=	fator de aumento da máquina fotográfica
n	=	índice de refração
p	=	probabilidade estatística
q	=	carga eléctrica
r	=	raio de partícula esférica
s	=	fator de aumento da fórmula de Wiedemann
t	=	tempo
u	=	mobilidade electroforética
v	=	velocidade electroforética
w	=	caminho traçado pela imagem da divisa
x	=	abscissa da curva de Gauss
y	=	ordenada da curva de Gauss
z	=	valência
α	=	fracção da globulina plasmática
β	=	fracção da globulina plasmática
γ	=	fracção da globulina plasmática
δ	=	desvio vertical da luz
ϵ	=	constante di-eléctrica
ζ	=	potencial electrocinético
η	=	constante de viscosidade
θ	=	ângulo de fenda inclinada
κ	=	constante de Debye e Hückel
μ	=	força iónica
σ	=	desvio padrão da distribuição de Gauss
φ	=	fibrinogénio
Δ	=	diferença
Σ	=	soma

VII) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Nota: Incluímos apenas aquelas publicações que contêm detalhes da técnica electroforética e da análise dos perfis.

1. *Abramson, H. A.* — Influence of size, shape, and conductivity on cataphoretic mobility, and its biological significance, *J. Phys. Chem.* 35: 289, 1931.
2. *Abramson, H. A.* — Electrokinetic Phenomena and their Application to Biology and Medicine, New York, Chemical Catalog Company, 1934.
3. *Abramson, H. A., Moyer, L. S., Gorin, M. H.* — Electrophoresis of proteins, New York, Reinhold Publishing Corporation, 1942.
4. *Burton, E. F.* — Helmholtz double layer related to ions and charged particles, Colloid Symposium Monograph, New York, Chemical Catalog Company Inc., 1926, vol. 3, pp. 132-144.
5. *Dole, V. P.* — A theory of moving boundary systems formed by strong electrolytes, *J. Am. Chem. Soc.*, 67: 1.119, 1945.

6. Edsall, J. T. — The plasma proteins and their fractionation. 2. Electrophoretic Measurements, in Anson, M. L. & Edsall, J. T., *Advances in Protein Chemistry*, New York, Academic Press Inc. Publishers, 1947, vol. 3, pp. 392-401.
7. Freundlich, H. — *Kapillarchemie*, Leipzig, Akademische Verlagsgesellschaft m.b.H., 1909, pp. 223-231.
8. Geddes, A. L. — Diffusivity, in Weissberger, A., *Physical Methods of Organic Chemistry*, New York, Interscience Publishers Inc., 1945, pp. 295-303.
9. Gouy, L. — Sur la constitution de la charge électrique à la surface d'un électrolyte, *Journ. de Phys.*, 9: 457, 1910.
10. Kekwick, R. A. — The electrophoretic analysis of normal human plasma, *Biochem. J.*, 33: 1.122, 1939.
11. Lamm, O. — Zur Bestimmung von Konzentrationsgradienten mittels gekrümmter Lichtstrahlen, *Ztschr. Phys. Chem.*, 138: 313, 1928.
12. Longsworth, L. G. — A modification of the Schlieren method for use in electrophoretic analysis, *J. Am. Chem. Soc.*, 61: 529, 1939.
13. Longsworth, L. G. — Recent Advances in the Study of Proteins by Electrophoresis, *Chem. Rev.*, 30: 323, 1942.
14. Longsworth, L. G. — Optical Methods in Electrophoresis, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, 18: 219, 1946.
15. Longsworth, L. G., & MacInnes, D. A. — Electrophoresis of proteins by Tiselius Method, *Chem. Rev.*, 24: 271, 1939.
16. Longsworth, L. G., & MacInnes, D. A. — The interpretation of simple electrophoretic patterns, *J. Am. Chem. Soc.*, 62: 705, 1940.
17. MacInnes, D. A. — *The Principles of Electrochemistry*, New York, Reinhold Publishing Corp., 1939.
18. MacInnes, D. A. & Longsworth, L. G. — The electrophoretic study of proteins and related substances, in Alexander, J., *Colloid Chemistry*, New York, Reinhold Publishing Corp., 1944, vol. 5, pp. 387-411.
19. Moore, D. H. — Optical Methods in Electrophoretic and Ultracentrifugal Analyses, in Glasser, O., *Medical Physics*, Chicago, Year Book Publishers Inc., 1944, pp. 827-830.
21. Perlmann, G. E. & Kaufman, D. — Effect of ionic strength and protein concentration in electrophoretic analysis of human plasma, *J. Am. Chem. Soc.*, 67: 638, 1945.
22. Philpot, J. St. L. — Direct photography of ultracentrifuge sedimentation curves, *Nature*, 141: 283, 1938.
23. Shedlowsky, T. — Conductometry, in Weissberger, A., *Physical Methods of Organic Chemistry*, New York, Interscience Publishers Inc., 1945, pp. 1.011-1.046.
24. Svensson, H. — Direkte photographische Aufnahme von Elektrophorese-Diagrammen, *Kolloid Ztschr.* 87: 181, 1939.
24. Tiselius, A. — Electrophoresis of serum globulins, *Biochem. J.*, 31: 1.464, 1937.
26. Tiselius, A. & Kabat, E. A. — Electrophoretic study of immune sera and purified antibody preparations. *J. Exp. Med.* 69: 119, 1939.
27. Wiedemann, E. — Die willkürliche Modifizierung der Milieubedingungen bei Elektrophorese-Versuchen zur Eliminierung der Extragradien und ihre praktische Bedeutung. *Helv. Chim. Acta*, 30: 168, 1947.

28. Wiedemann, E. — Über die Genauigkeit der Aufzeichnung von Elektrophorese — Diagrammen nach der Methode Philpot-Svensson bei Anwendung des Kleinbildverfahrens. *Helv. Chim. Acta*, 30: 639, 1947.
29. Wiedemann, E. — Ein neuer Spalt für die Aufnahme von Elektrophorese-Diagrammen nach Philpot-Svensson. *Helv. Chim. Acta*, 30: 648, 1947.
30. Wiedemann, E. — Über die Auswertung von Elektrophorese-Diagrammen nach Longsworth und Philpot-Svensson. *Helv. Chim. Acta*, 30: 892, 1947.
31. Wuhrmann, F. & Wunderly, Ch. — Die Bluteiweisskörper des Menschen. Basal, Benno Schwabe & Co., Verlag 1947.